

**UJI AKTIVITAS SENYAWA ANTIKANKER EKSTRAK FUKOIDAN FRAKSI  
HCL DARI SARGASSUM CRISTAEFOLIUM PADA CELL LINE MCF-7  
SECARA IN-VITRO**

**SKRIPSI**

Oleh  
**ANIS NUR AZIZAH**

**NIM 175100501111006**



**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN**

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**2021**



**UJI AKTIVITAS SENYAWA ANTIKANKER EKSTRAK FUKOIDAN FRAKSI  
HCL DARI SARGASSUM CRISTAEFOLIUM PADA CELL LINE MCF-7  
SECARA IN-VITRO**

**SKRIPSI**

Oleh

**ANIS NUR AZIZAH**

**NIM 175100501111006**

Sebagai salah satu syarat memperoleh  
Gelar Sarjana Bioteknologi



**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN**

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**2021**



LEMBAR PERSETUJUAN

Judul TA : Uji Aktivitas Senyawa Antikanker Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl dari *Sargassum cristaefolium* pada Cell line MCF-7 secara *In-vitro*

Nama Mahasiswa : Anis Nur Azizah

NIM : 175100501111006

Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Pembimbing

Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA  
NIP. 195906131986011001

Tanggal Persetujuan: 04 Agustus 2021



LEMBAR PENGESAHAN

Judul TA : Uji Aktivitas Senyawa Antikanker Ekstrak Fukoidan  
 Fraksi HCl dari *Sargassum cristaefolium* pada Cell line  
 MCF-7 secara *In-vitro*

Nama Mahasiswa : Anis Nur Azizah

NIM : 175100501111006

Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Penguji I

Prof. Dr. Ir. Simon Bambang Widjanarko, M.App.Sc  
NIP. 19521003 197903 1 002

Dosen Penguji II

Ir. Aji Sutrisno, M.Sc, Ph.D  
NIP. 19680223 199303 1 002

Dosen Pembimbing

Prof. Dr. Ir. Yuniarta, DEA  
NIP. 19590613 1986011 001

Ketua Jurusan



Dr. Widya Dwi Rukmi Putri, STP., MP  
NIP. 19700504 1999032 002

Tanggal Persetujuan: 04 Agustus 2021



## RIWAYAT HIDUP



Anis Nur Azizah, lahir di Tulungagung pada tanggal 04 Oktober 1998 dari pasangan Handayani dan Sukarmi. Penulis adalah anak pertama dari dua bersaudara, dengan adik bernama Danang Dwi Handika. Penulis telah menyelesaikan jenjang Pendidikan dini di TK PGRI Purworejo pada tahun 2005 yang dilanjutkan jenjang sekolah dasar di SDN 2 Purworejo pada tahun 2011. Penulis menyelesaikan jenjang Pendidikan sekolah menengah pertama pada tahun 2014 di SMPN 1 Ngunut yang dilanjutkan jenjang Pendidikan menengah atas pada tahun 2017 di SMAN 1 Kedungwaru.

Penulis melanjutkan jenjang pendidikan studi perguruan tinggi pada tahun 2017 di Universitas Brawijaya sebagai mahasiswi Fakultas Teknologi Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Program Studi Bioteknologi. Selama perkuliahan, penulis aktif dalam berbagai kegiatan akademik maupun non-akademik. Penulis juga turut mengikuti perlombaan serta mendapat penghargaan, seperti diantaranya yakni Juara 2 LKTIN PRISMA 8 Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya pada tahun 2019 dan mendapat pendanaan pada Program Mahasiswa Wirausaha (PMW) Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan pada tahun 2020. Selain mendapat penghargaan, penulis juga turut aktif dalam organisasi *Agritech Research and Study Club* (ARSC) dengan amanah sebagai sekretaris bidang Penulisan dan Kompetisi (PENKOM) pada masa jabatan 2019/2020. Selain hal tersebut, penulis juga mejadi asisten praktikum seperti kimia organik, biokoimia, dan rekayasa genetika.



Alhamdu lillahi rabbil 'alamin,

Akhirnya karya ini telah selesai,

Karya ini dipersembahkan kepada keluarga dan teman-teman

## PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR

Nama Mahasiswa : Anis Nur Azizah

NIM : 175100501111006

Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Teknologi Pertanian

Judul TA : Uji Aktivitas Senyawa Antikanker Ekstrak Fukoidan  
Fraksi HCl dari *Sargassum cristaefolium* pada Cell  
Line MCF-7 secara *In-vitro*

Menyatakan bahwa,

Tugas akhir dengan judul di atas merupakan karya asli penulis tersebut di atas.

Apabila dikemudian hari terbukti pernyataan ini tidak benar, saya bersedia dituntut  
sesuai dengan hukum yang berlaku.

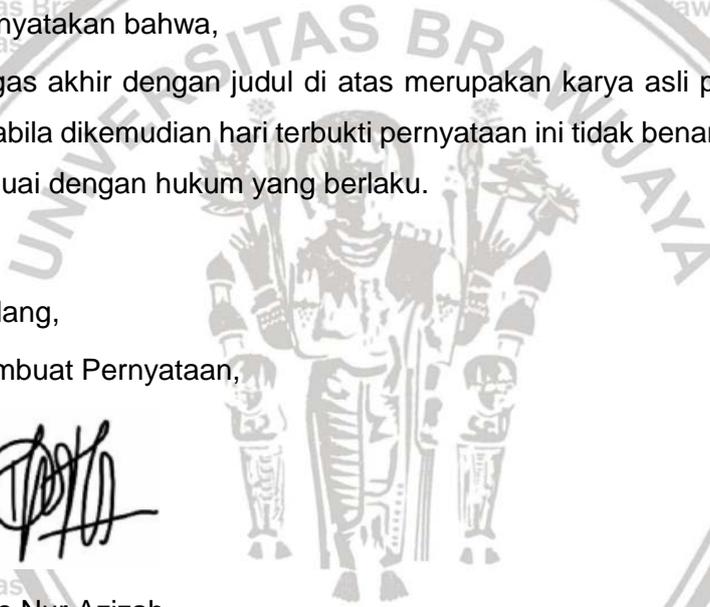
Malang,

Pembuat Pernyataan,



Anis Nur Azizah

NIM. 175100501111006



### PERNYATAAN PEMBIAYAAN TUGAS AKHIR

Penelitian ini merupakan bagian proyek penelitian a.n:

Nama Dosen : Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA

NIP : 195906131986011001

Nama Penelitian : Fukoidan sebagai Senyawa Antikanker

Penelitian untuk tugas akhir ini dibiayai oleh proyek tersebut

Pembuat pernyataan



Anis Nur Azizah  
NIM. 175100501111006



Anis Nur Azizah, 175100501111006. Uji Aktivitas Senyawa Antikanker Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl dari *Sargassum cristaefolium* pada Cell line MCF-7 secara *In-vitro*. Tugas Akhir. Dosen Pembimbing: Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA

## RINGKASAN

*Sargassum cristaefolium* merupakan salah satu spesies dari rumput laut coklat genus *Sargassum sp.* Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar *Sargassum sp.* memiliki sifat farmakologis, termasuk antikanker, antiinflamasi, antioksidan, dan aktivitas antibakteri. Fukoidan adalah polisakarida sulfat dalam ekstrak kasar *Sargassum sp.* Fukoidan dari *Sargassum cinereum*, *Sargassum ilicifolium*, *Turbinaria sp.*, dan *Padina sp.* telah menunjukkan aktivitas antikankernya. Berdasarkan uraian di atas, fukoidan berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen kemopreventif yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak fukoidan dari fraksi HCl *S. cristaefolium* terhadap sitotoksitas dan apoptosis sel kanker payudara MCF-7. Aktivitas sitotoksitas dilakukan dengan uji MTT selama 24 jam menggunakan variasi ekstrak fukoidan 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 dan 800 ppm. Selanjutnya viabilitas sel hidup dihitung menggunakan hemositometer dengan variasi waktu inkubasi 24, 48, dan 72 jam. Uji apoptosis dilakukan dengan pewarnaan sel menggunakan Hoechst 33342 dengan variasi waktu 24, 48 dan 72 jam.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai IC<sub>50</sub> fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium* pada kultur sel kanker payudara MCF-7 adalah 287,5 ppm. Jumlah sel hidup meningkat dengan lamanya waktu inkubasi, tetapi viabilitas sel menurun. Uji ANOVA dan uji Tukey menunjukkan bahwa waktu inkubasi berpengaruh nyata terhadap jumlah sel. Pada uji apoptosis dengan menggunakan zat warna Hoechst 33342 menunjukkan bahwa pada waktu inkubasi 24 dan 48 jam sel mulai mengalami apoptosis yang ditunjukkan dengan banyaknya luminescence biru dan kodifikasi kromatin serta pengurangan volume sel dan pada inkubasi 72 jam sel telah sepenuhnya terdefragmentasi. Dapat disimpulkan bahwa fukoidan fraksi HCl *S. cristaefolium* menunjukkan kemampuannya sebagai senyawa antikanker dan tergolong senyawa antikanker yang cukup aktif.

**Kata Kunci:** Apoptosis, Fukoidan, MCF-7, MTT Assay, *Sargassum cristaefolium*

Anis Nur Azizah. 175100501111006. Activity Test of Anticancer Compounds Fucoidan Extract of HCl Fraction from *Sargassum cristaefolium* on Cell line MCF-7 by In-vitro.

TA. Supervisor: Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA

### SUMMARY

*Sargassum cristaefolium* is one of the species of *Sargassum sp.* genus of brown seaweed. Several paper reports showed that crude extract of *Sargassum sp.* has pharmacological properties, including anticancer, anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activity. Fucoidan is a sulphated polysaccharide in a crude extract of *Sargassum sp.* Fucoidan of *Sargassum cinereum*, *Sargassum ilicifolium*, *Turbinaria sp.*, and *Padina sp* have shown their anticancer activity. Based on the description above, fucoidan can be developed as a chemopreventive agent that can inhibit the growth of cancer cells.

This study aimed to determine the activity of fucoidan HCL fraction extract from *S. cristaefolium* against cytotoxicity and apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. Cytotoxicity activity was carried out by MTT test for 24 hours using a variation of fucoidan extract of 12.5; 25; 50; 100; 200; 400, and 800 ppm. Furthermore, the viability of living cells was calculated using a haemocytometer with variations in incubation time of 24, 48, and 72 hours. The apoptosis test was carried out by staining cells using the Hoechst 33342 with variations in 24, 48 and 72 hours.

The results showed that IC<sub>50</sub> value of fucoidan HCl fraction from *S. cristaefolium* on MCF-7 cell line culture was 287.5 ppm. The number of living cells increased with the length of incubation time, but cell viability decreased. ANOVA test and Tukey's test showed that incubation time had a significant effect on the number of cells. In the apoptosis test using Hoechst 33342 dye, it was shown that cells began to undergo apoptosis at an incubation time of 24 and 48 hours. The Cells undergone apoptosis, indicated by the amount of blue luminescence and chromatin codification and cell volume reduction and at 72 hours incubation, cell have been completely defragmented. It can be concluded that fucoidan of the HCl fraction of *S. cristaefolium* showed its ability as anticancer compound and is classified as quite an active anticancer.

**Keywords:** Apoptosis, Fucoidan, MCF-7 cell line, MTT Assay, *Sargassum cristaefolium*

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan yang Maha Esa, atas rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan Laporan tugas akhir yang berjudul **“Uji Aktivitas Senyawa Antikanker Ekstrak Fukoidan Fraksi HCI dari *Sargassum cristaefolium* pada *Cell line* MCF-7 secara *In-vitro*”**. Tugas akhir ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Bioteknologi. Penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Tuhan yang Maha Esa atas limpahan rahmat-Nya,
2. Kedua orang tua dan segenap keluarga atas dukungan dan do'a yang diberikan,
3. Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA selaku dosen pembimbing tugas akhir,
4. Bapak Tunjung Mahatmanto, STP., M.Si., Ph.D selaku ketua program studi Bioteknologi,
5. Dr. Widya Dwi Rukmi Putri, STP., MP selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang,
6. Semua Ibu dan Bapak Dosen Bioteknologi atas ilmu yang sangat bermanfaat,
7. Laboran LSIH Divisi *Molecular & Cellular Biology* Bu Helly & Bu Unil atas bimbingan dan ilmu yang diberikan,
8. Teman-teman satu proyek Yohana, Kak Balqis, dan Kak Mey yang telah banyak membantu dalam menyelesaikan tugas akhir,
9. Sahabat-sahabat terbaik Hesti, Salsa, Ashin, Aul, Indah, Ida, dan Rosita yang tidak bosan mendengar keluhan dan selalu memberi semangat,
10. Pengurus Harian dan seluruh keluarga besar ARSC 2020, serta semua teman-teman yang turut membantu dalam menyelesaikan laporan ini.

Demikian yang dapat saya sampaikan. Penulis menyadari bahwa laporan ini masih memiliki banyak kekurangan. Oleh karena itu, diharapkan adanya kritik dan saran yang membangun untuk kesempurnaan laporan ini. Atas kesempatan yang diberikan, diucapkan terima kasih.

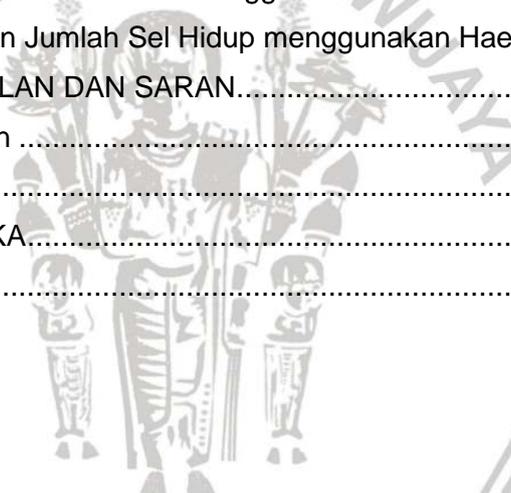
Malang, 1 November 2020

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN .....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
RIWAYAT HIDUP .....	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR .....	vi
PERNYATAAN PEMBIAYAAN TUGAS AKHIR .....	vii
RINGKASAN .....	viii
SUMMARY .....	viii
KATA PENGANTAR .....	x
DAFTAR ISI .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xv
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan .....	3
1.4 Manfaat .....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	5
2.1 <i>Sargassum cristaefolium</i> .....	5
2.2 Ekstraksi Fukoidan .....	6
2.3 Fukoidan .....	7
2.4 Senyawa Antikanker .....	10
2.5 Kanker .....	11
2.5.1 Pengertian Kanker .....	11
2.5.2 Kanker Payudara .....	11
2.5.3 Penyebab Kanker .....	12
2.5.4 Mekanisme Kanker .....	12
2.5.5 Terapi Adjuvant pada Kanker Payudara .....	13
2.5.6 Pengobatan Kanker yang Sudah Ada .....	14
2.5 MCF-7 .....	15
2.6 Uji Sitotoksik Metode <i>MTT</i> Assay .....	16
2.7 Haemocytometer .....	18
2.8 Apoptosis .....	20
2.9 Metode Pewarnaan Hoechst 33342 .....	22

2.10 Hipotesis .....	23
<b>BAB III. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>24</b>
3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan.....	24
3.2 Alat dan Bahan.....	24
3.2.1 Alat.....	24
3.2.2 Bahan.....	24
3.3 Metode.....	25
3.4 Kerangka Penelitian.....	26
3.5 Pelaksanaan.....	27
3.5.1 Tahap Persiapan.....	27
3.5.2 Tahap Pengujian.....	34
3.6 Analisis Data.....	38
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>40</b>
4.1 Uji IC <sub>50</sub> dengan Metode MTT Assay.....	40
4.2 Uji Apoptosis Sel MCF-7 menggunakan Pewarna Hoechst 33342.....	45
4.3 Perhitungan Jumlah Sel Hidup menggunakan Haemocytometer.....	48
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>51</b>
5.1 Kesimpulan.....	51
5.2 Saran.....	51
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>53</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>62</b>



**DAFTAR TABEL**

**Tabel 2.1** Bahan dan Senyawa Antikanker..... 10

**Tabel 2.2** Nilai IC<sub>50</sub> Senyawa-senyawa Antikanker terhadap Sel Kanker Payudara..... 18

**Tabel 4.1** Data Absorpsi Uji MTT Assay dan Viabilitas Sel MCF-7 yang Ditambahkan Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl *S. cristaefolium*..... 40

**Tabel 4.2** Nilai IC<sub>50</sub> Fukoidan Fraksi HCl dari *S. cristaefolium* dan Fukoidan Standar Komersial..... 44

**Tabel 4.3** Hasil Uji *Pired T Test* Nilai IC<sub>50</sub> antara Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl dengan Ekstrak Fukoidan Komersial pada Tingkat Kepercayaan 95% ..... 45

**Tabel 4.4** Hasil Uji Lanjut Tukey dengan Tingkat Kepercayaan 95%..... 50



**DAFTAR GAMBAR**

**Gambar 2. 1** *Sargassum sp.* (Pakidi & Suwono, 2016)..... 5

**Gambar 2. 2** Struktur Kimia Fukoidan dari *Sargassum sp.* (Satyarsa, 2019)..... 7

**Gambar 2.3** Mekanisme Induksi Apoptosis Fukoidan (Satyarsa, 2019)..... 9

**Gambar 2.4** Mekanisme Kanker (Kurniasari, 2017) ..... 13

**Gambar 2.5** *Cell line* MCF-7 dalam Gambar 2D dan 3D (Do Amaral *et al.*, 2011) ..... 16

**Gambar 2.6** Prinsip Kerta Uji Sitotoksis Metode MTT Assay (Amalia, 2016) ..... 17

**Gambar 2.7** Kolom Haemocytometer (Roberts, *et al.*, 2000) ..... 19

**Gambar 2.8** Proses Apoptosis (Sharma *et al.*, 2014). ..... 21

**Gambar 2.9** Sel MCF-7 yang diberi pewarna Hoechst 33342 (Chantree, *et al.*, 2021)..... 22

**Gambar 3.1** Kerangka Penelitian ..... 26

**Gambar 4.1** Kurva Regresi Linear Perhitungan  $IC_{50}$ ..... 42

**Gambar 4.2** Perhitungan Nilai  $IC_{50}$  menggunakan Software AATBio ..... 43

**Gambar 4.3.** Hasil Pembacaan Uji Apoptosis dengan Pewarna Hoechst 33342 pada Berbagai Variasi Waktu Pemberian Sampel Uji menggunakan Mikroskop Fluorescence pada Perbesaran 100x. .... 46

**Gambar 4.4** Grafik Pengaruh Waktu Inkubasi antara Sel Uji dan Kontrol Sel terhadap Jumlah Sel Hidup..... 48

**Gambar 4.5** Grafik Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Persen Viabilitas Sel ... 49

**DAFTAR LAMPIRAN**

**Lampiran 1.** Diagram Alir Penelitian..... 62

**Lampiran 2.** Perhitungan Pengenceran Bertingkat Sampel Uji Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl..... 75

**Lampiran 3.** Denah Wellplate untuk Pengujian ..... 77

**Lampiran 4.** Gambar Kondisi Sel Setelah Diberi Perlakuan Variasi Sampel Uji 0-800 ppm Selama 24 Jam dan Diberi Reagen MTT Dilihat Menggunakan Mikroskop Inverted pada Perbesaran 100x..... 80

**Lampiran 5.** Hasil Uji MTT Assay..... 81

**Lampiran 6.** Hasil Perhitungan Sel Hidup menggunakan Haemocytometer ..... 82

**Lampiran 7.** Hasil Uji Analysis of Variance (ANOVA) pada Perlakuan Waktu Inkubasi dan Uji Lanjut Tukey ..... 84

**Lampiran 8.** Dokumentasi Uji Hoechst 33342 Sebelum Proses Pewarnaan .... 85

**Lampiran 9.** Dokumentasi Uji Jumlah Sel Hidup menggunakan Haemocytometer ..... 86



## BAB I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Sargassum sp.* adalah spesies dari rumput laut cokelat (Saraswati *et al.*, 2020). Menurut Kadi (2005), terdapat 150 jenis *Sargassum sp.* di perairan tropis, subtropis, dan daerah musim dingin. Di Indonesia sendiri, diperkirakan terdapat 15 jenis *Sargassum*, salah satunya adalah *Sargassum cristaefolium* dan 12 jenis lainnya telah diteliti yaitu *S. aquofillum*, *S. polyceratium*, *S. vulgare*, *S. polycystum*, *S. Microphyllum*, *S. obtusilum*, *S. crassifolium*, *S. gracilium*, *S. binderi*, *S. echinocarpum*, *S. hystrix*, dan *S. duplicatum* (Sinurat & Kusumawati, 2017). Di wilayah Asia Timur, *Sargassum sp.* telah populer digunakan sebagai bahan makanan dan obat-obatan. Ekstrak kasar dari *Sargassum sp.* memiliki sifat farmakologi, diantaranya antikanker, anti inflamasi, antioksidan, dan antibakteri (Saraswati *et al.*, 2020). Salah satu ekstrak pada *Sargassum sp.* yang dipercaya memiliki sifat farmakologi adalah fukoidan (Li *et al.*, 2008). Fukoidan merupakan kelas dari polimer kaya fukosa yang tersulfasi dengan berat molekul 2000 Da (Satyarsa, 2019). Penelitian sebelumnya telah melakukan pengujian fukoidan sebagai senyawa antikanker yang berasal dari *S. cinereum* Narayani *et al.* (2019) dan *S. ilicifolium* (Al-Muqbali *et al.*, 2019). Selain dari *Sargassum sp.*, fukoidan juga dapat diperoleh dari *Turbinaria sp.* dan *Padina sp.* Berdasarkan penelitian dari Isnansetyo *et al.* (2017) terkait sitotoksitas fukoidan dari 3 alga coklat, menjelaskan bahwa fukoidan dari *Turbinaria sp.* dan *Padina sp.* juga memiliki aktivitas antikanker yang diujikan pada *cell line* kanker payudara MCF-7 dengan aktivitas sitotoksik 461-633 µg/mL dan 144 µg/mL.

Ekstrak fukoidan dapat diperoleh dengan cara ekstraksi. Ekstraksi fukoidan dapat menggunakan berbagai pelarut yaitu air dan HCl. Namun, pelarut HCl lebih sering digunakan karena mampu memotong ikatan polisakarida dengan protein yang berada di dalam sel. Ekstraksi menggunakan HCl dipilih dikarenakan dapat menghasilkan rendemen yang tinggi, namun menghasilkan alginat yang banyak, sehingga diperlukan presipitasi alginat untuk memisahkan ekstrak fukoidan dengan alginat (Sinurat & Kusumawati, 2017). Ekstraksi menggunakan HCl tidak merusak fukoidan jika konsentrasi HCl yang digunakan tidak terlalu tinggi  $\pm 0,03$  M dan dikombinasikan dengan waktu ekstraksi yang singkat  $\pm 15$  menit (Laeliocattleya *et al.*, 2020). Berdasarkan penelitian Sinurat & Kusumawati (2017),

yang melaksanakan penelitian terkait ekstraksi fukoidan dari *S. binderi* SONDER mendapatkan hasil ekstraksi menggunakan HCl 0,1 N pada suhu 85°C selama 4 jam mendapatkan rendemen fukoidan sebesar 6%, sedangkan ekstraksi menggunakan aquades pada suhu 85°C selama 4 jam mendapatkan rendemen fukoidan sebesar 3,36%.

Efektivitas ekstrak fukoidan fraksi HCl berdasarkan Yang *et al.* (2008) yang melakukan penelitian terkait pengaruh berat molekul dan kondisi hidrolisis pada aktivitas antikanker fukoidan dari *Undaria pinnatifida* menunjukkan hasil bahwa ekstraksi fukoidan menggunakan fraksi HCl mampu meningkatkan aktivitas antikanker sebesar 75,9% dibandingkan dengan fraksi air yang memiliki aktivitas antikanker sebesar 37,6%. Penelitian yang sejenis dilakukan oleh Ponce *et al.* (2003), terkait ekstraksi fukoidan dari *Adenocystis utricularis* menggunakan HCl, pH 2, dan suhu 70°C menghasilkan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 4,79±2,20 ppm, sedangkan ekstraksi menggunakan air pada suhu 70°C menghasilkan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 24,73±0,56 ppm. Ponce *et al.* (2003) juga melakukan ekstraksi fukoidan dari *Adenocystis utricularis* menggunakan pelarut HCl pada suhu ruang menghasilkan nilai nilai IC<sub>50</sub> sebesar 1,25±0,30 ppm, sedangkan menggunakan pelarut air pada suhu ruang menghasilkan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 2,10±0,56 ppm. Berdasarkan penelitian tersebut, dapat diartikan bahwa ekstraksi menggunakan pelarut HCl menghasilkan efektivitas ekstrak fukoidan yang lebih tinggi.

Pada penelitian ini memanfaatkan ekstrak fukoidan sebagai senyawa antikanker payudara dikarenakan kanker payudara adalah kanker yang sering didiagnosis dan penyebab kematian utama akibat kanker pada wanita (Comşa *et al.*, 2015). *Cell line* merupakan kunci untuk diagnosis molekuler kanker payudara karena dapat digunakan secara luas diberbagai aspek penelitian, khususnya secara *in-vitro*. *Cell line* yang digunakan dalam penelitian ini adalah MCF-7 dikarenakan memiliki beberapa kelebihan diantaranya mudah dikulturkan; stabil; dapat digunakan untuk studi Esterogen- $\alpha$ ; memiliki banyak sub-klon; mampu mempertahankan karakteristik epitel sel, sehingga karakteristiknya mirip dengan kanker payudara yang ada di dalam tubuh, serta memiliki sifat khusus yaitu resisten terhadap doxorubicin (Comşa *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015; Nunes *et al.*, 2019); serta belum ada penelitian terkait uji aktivitas ekstrak fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium* yang diujikan pada sel MCF-7.

Manfaat ekstrak fukoidan fraksi HCl sebagai senyawa antikanker kedepannya adalah untuk terapi adjuvant. Terapi adjuvant merupakan terapi tambahan yang

ditambahkan disamping terapi utama. Terapi adjuvant diberikan setelah dilakukan pembedahan atau operasi (Windrasari *et al.*, 2019; Wulandari, 2012). Telah banyak penelitian pemanfaatan ekstrak alam sebagai terapi adjuvant dikarenakan memiliki efek samping yang lebih minimal dan banyaknya sumber daya alam yang dimiliki Indonesia yang dapat dikembangkan, salah satunya berdasarkan penelitian Salsabila *et al.* (2018), terkait potensi rumput gong sebagai antikanker payudara pada berbasis bahan alam menunjukkan hasil ekstrak rumput gong memiliki nilai IC<sub>50</sub> sebesar 131,921 ppm terhadap sel T47D (sel kanker payudara) dan 413,042 ppm terhadap sel vero (sel normal). Hasil uji selektivitas menunjukkan angka 3 yang artinya selektif dalam menghambat sel T47D.

Namun, hingga saat ini belum ada penelitian terkait uji aktivitas antikanker ekstrak fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium* secara *in-vitro* yang kedepannya dapat dimanfaatkan sebagai terapi adjuvant. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi ekstrak fukoidan fraksi HCl sebagai senyawa antikanker pada sel MCF-7.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Apakah ekstrak fukoidan dari *S. cristaefolium* yang diujikan pada *cell line* MCF-7 menggunakan metode MTT Assay memiliki aktivitas antikanker?
2. Apakah ekstrak fukoidan dari *S. cristaefolium* berpengaruh terhadap proses apoptosis *cell line* MCF-7?
3. Apakah ekstrak fukoidan dari *S. cristaefolium* berpengaruh terhadap jumlah sel hidup *cell line* MCF-7?

## 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui aktivitas senyawa antikanker ekstrak fukoidan dari *S. cristaefolium* yang diujikan pada *cell line* MCF-7 menggunakan metode MTT Assay.
2. Mengetahui pengaruh ekstrak fukoidan dari *S. cristaefolium* terhadap proses apoptosis *cell line* MCF-7.
3. Mengetahui pengaruh ekstrak fukoidan dari *S. cristaefolium* terhadap jumlah sel hidup *cell line* MCF-7.

#### 1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Hasil penelitian uji aktivitas senyawa antikanker fukoidan dari *S. cristaefolium* pada *cell line* MCF-7 secara *in-vitro* dapat digunakan untuk meningkatkan manfaat dari *S. cristaefolium* sebagai bahan organik untuk pengobatan antikanker atau agen kemopreventif.
2. Penelitian ini dapat digunakan sebagai referensi untuk penelitian sejenis dan penelitian selanjutnya.



## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Sargassum cristaefolium*

*Sargassum sp.* adalah spesies dari rumput laut cokelat (Saraswati *et al.*, 2020). Klasifikasi *Sargassum* adalah sebagai berikut Pakidi & Suwono (2016):

Divisi : Thallophyta

Kelas : Phaeophyceae

Ordo : Fucales

Famili : Sargassaceae

Genus : *Sargassum*

Spesies : *Sargassum cristaefolium*



Gambar 2. 1 *Sargassum sp.* (Pakidi & Suwono, 2016)

Menurut (Kadi, 2005), terdapat 150 jenis *Sargassum sp.* di perairan tropis, subtropis, dan daerah musim dingin. Di Indonesia, diperkirakan terdapat 15 jenis *Sargassum sp.* dan 12 jenis telah dikenal, salah satunya adalah *S. cristaefolium*.

*Sargassum sp.* dapat ditemukan di berbagai wilayah Indonesia, oleh sebab itu pada daerah tertentu *Sargassum sp.* memiliki sebutan yang berbeda-beda. Di Kepulauan Seribu, *Sargassum sp.* disebut dengan Oseng dan di Banten dinamakan Kembang Karang. Secara ekologis, *Sargassum sp.* turut andil dalam pembentukan ekosistem terumbu karang dan merupakan tempat hidup bagi biota kecil. Di wilayah Asia Timur, *Sargassum sp.* telah populer digunakan sebagai bahan makanan dan obat-obatan. Ekstrak *Sargassum sp.* mengandung air 12,59 %, abu 51,30 %, lemak 22,90 %, serat 0,89 % dan nitrogen 20,94%, protein, mineral, polisakarida, vitamin dan beberapa senyawa yakni laminaran, fukoidan, selulosa, manitol, fenolat, kompleks diterpenoid, terpenoid aromatik, saponin dan flavonoid (Satyarsa, 2019). Berdasarkan Pramesti *et al.* (2017), menjelaskan

bahwa *Sargassum sp.* memiliki sifat farmakologis yang menjanjikan seperti antivirus, antitumor, antioksidan, antifouling, dan antijamur.

## 2.2 Ekstraksi Fukoidan

Ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kelarutan. Ekstraksi sangat berpengaruh terhadap mutu ekstrak yang dihasilkan.

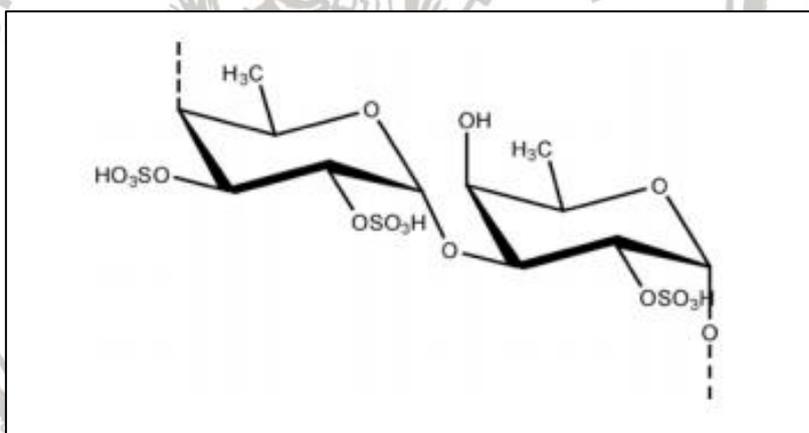
Faktor-faktor dalam ekstraksi yang mempengaruhi mutu fukoidan adalah proses ekstraksi, jenis pelarut ekstraksi, suhu, dan waktu ekstraksi. Ekstraksi fukoidan dapat menggunakan berbagai macam pelarut yaitu air, pelarut asam, dan penambahan garam kalsium. Ekstraksi menggunakan pelarut asam dengan tujuan untuk memutus ikatan antara polisakarida dengan protein di dalam sel. Ekstraksi menggunakan pelarut asam umumnya dikombinasikan dengan waktu ekstraksi yang tidak terlalu lama dan konsentrasi pelarut asam yang tidak terlalu tinggi. Sedangkan, ekstraksi menggunakan air memiliki tujuan untuk memutus ikatan non-kovalen antara fukoidan dengan dinding sel. Ekstraksi menggunakan air umumnya dikombinasikan dengan suhu tinggi. Setelah penambahan pelarut, kemudian ditambahkan garam kalsium ( $\text{CaCl}_2$ ) yang berfungsi untuk memisahkan fukoidan dengan alginat, dimana alginat merupakan salah satu bahan penyusun dari rumput laut (Laeliocattleya *et al.*, 2020; Sinurat & Kusumawati, 2017).

Beberapa penelitian sebelumnya telah membandingkan hasil ekstraksi dan efektivitas fukoidan menggunakan pelarut asam dengan air, yaitu penelitian Sinurat & Kusumawati (2017), yang melaksanakan penelitian terkait ekstraksi fukoidan dari *S. binderi* SONDER mendapatkan hasil ekstraksi menggunakan HCl 0,1 N pada suhu 85°C selama 4 jam mendapatkan rendemen fukoidan sebesar 6%, sedangkan ekstraksi menggunakan aquades pada suhu 85°C selama 4 jam mendapatkan rendemen fukoidan sebesar 3,36%. Efektivitas ekstrak fukoidan fraksi HCl berdasarkan Yang *et al.* (2008) yang melakukan penelitian terkait pengaruh berat molekul dan kondisi hidrolisis pada aktivitas antikanker fukoidan dari *Undaria pinnatifida* menunjukkan hasil bahwa ekstraksi fukoidan menggunakan fraksi HCl mampu meningkatkan aktivitas antikanker sebesar 75,9% dibandingkan dengan fraksi air yang memiliki aktivitas antikanker sebesar 37,6%. Penelitian yang sejenis dilakukan oleh Ponce *et al.* (2003), terkait ekstraksi fukoidan dari *Adenocystis utricularis* menggunakan HCl, pH 2, dan suhu 70°C menghasilkan nilai  $\text{IC}_{50}$  sebesar  $4,79 \pm 2,20$  ppm, sedangkan ekstraksi menggunakan air pada suhu 70°C menghasilkan nilai  $\text{IC}_{50}$  sebesar  $24,73 \pm 0,56$  ppm. Ponce *et al.* (2003) juga melakukan ekstraksi fukoidan dari *Adenocystis*

*utricularis* menggunakan pelarut HCl pada suhu ruang menghasilkan nilai nilai  $IC_{50}$  sebesar  $1,25 \pm 0,30$  ppm, sedangkan menggunakan pelarut air pada suhu ruang menghasilkan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $2,10 \pm 0,56$  ppm. Berdasarkan penelitian tersebut, dapat diartikan bahwa ekstraksi menggunakan pelarut HCl menghasilkan efektivitas ekstrak fukoidan yang lebih tinggi.

### 2.3 Fukoidan

Fukoidan merupakan senyawa penyusun pada rumput laut cokelat atau *Phaeophyceae* dan berdasarkan penelitian sebelumnya terkait struktur dan bioaktivitas fukoidan, menyatakan bahwa fukoidan mengandung senyawa antikanker (Li *et al.*, 2008). Pada penelitian Satyarsa, (2019) terkait potensi fukoidan sebagai inovasi terapi kanker payudara, menjelaskan bahwa dengan menggunakan *cell line* MCF-7, fukoidan dapat menghentikan metastases sel, dengan mempengaruhi proses Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, dan Bad, sehingga menurunkan imortilitas, transformasi dan timbulnya keganasan pada sel MCF-7. Potensi fukoidan dalam *Sargassum sp.* dapat menjadi terobosan terbaru sebagai terapi pada kanker, khususnya kanker payudara.

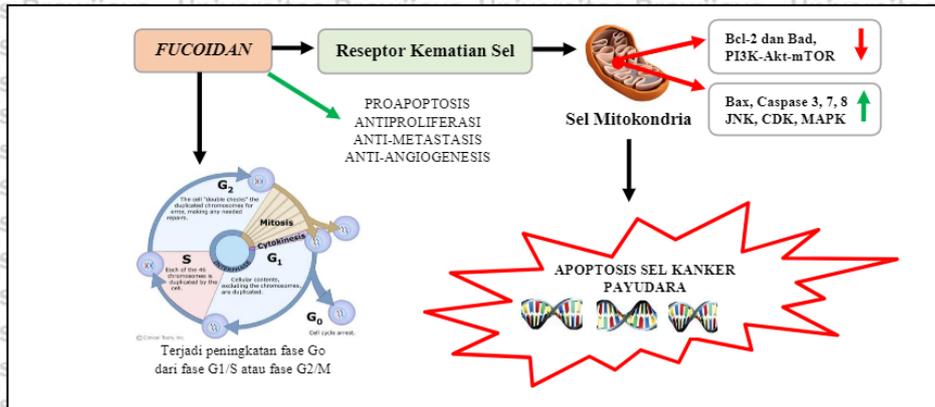


**Gambar 2. 2** Struktur Kimia Fukoidan dari *Sargassum sp.* (Satyarsa, 2019)

Fukoidan merupakan kelas dari polimer kaya fukosa yang tersulfasi dengan berat molekul 2000 Da. Senyawa fukoidan yang terdapat pada rumput laut cokelat merupakan senyawa garam kalsium, dan karbohidrat etersulfat dengan rumus  $C_6H_9O_3 \cdot SO_4$ . Molekul fukoidan secara umum mengandung 38,3% sulfat, 56,7% L-fukosa, dan 5% ion logam. Fukoidan pada umumnya terdapat dua bentuk, yaitu glikosaminoglikan (GAGs) atau F-fukoidan yang tersusun atas ester tersulfasi dan U-fukoidan yang tersusun dari 20% asam glukoronat (Satyarsa, 2019). Namun, struktur fukoidan sangat bergantung dari jenis rumput laut coklat, tetapi selalu

mengandung fukosa yang tersulfasi. Pada beberapa spesies pada bagian fukosa yang tersulfasi terdapat cabang, mengandung gula yang berbeda, fukosa, dan asam uronat (Van Weelden *et al.*, 2019). Perbedaan jenis sumber fukoidan juga akan mempengaruhi berat molekul dan gugus ester sulfat. Dimana berat molekul dan gugus ester sulfat merupakan faktor penting yang mempengaruhi aktivitas biologis dari fukoidan. Tingginya berat molekul pada fukoidan menyebabkan rendahnya kelarutan dan kemampuan proses, sehingga dapat menghambat penetrasi fukoidan pada sel target dalam menjalankan fungsinya. Sebaliknya, fukoidan dengan berat molekul yang rendah memiliki aktivitas biologis yang lebih tinggi. Sedangkan, gugus ester sulfat membawa muatan negatif dalam molekul yang dapat memfasilitasi pembentukan kompleks protein fukoidan yang terlibat dalam proliferasi sel (Saepudin *et al.*, 2018). Gugus ester sulfat sangat berpengaruh terhadap bioaktivitas fukoidan didukung oleh penelitian Ponce *et al.*, (2003), dimana melakukan ekstraksi fukoidan menggunakan pelarut air didapatkan kandungan sulfat sebesar 8% dan menggunakan pelarut HCl menghasilkan kandungan sulfat 24%. Kemudian, dilakukan uji sitotoksik dan didapatkan nilai  $IC_{50}$  ekstrak fukoidan pelarut air dan HCl secara berturut-turut  $24,73 \pm 1,46$  dan  $4,79 \pm 0,44$  ppm. Berdasarkan uraian tersebut, dapat diartikan bahwa ekstrak fukoidan yang mengandung sulfat tinggi memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih baik. Namun, belum diketahui secara pasti mekanisme sulfat terhadap sel target.

Frakasi polisakarida sulfat dari *S. fulvelum*, *L. angustata*, *L. angustata var. longissima*, *L. japonica*, *Ecklonia cava*, dan *Eisenia bicyclis* telah dilakukan uji bioaktivitasnya dan ditemukan bahwa mampu menghambat pertumbuhan pada sel sarcoma-180 yang ditanam pada tikus dan memiliki aktivitas antitumor melawan leukimia L-1210 pada tikus. Pengujian in-vitro menunjukkan fukoidan dari *Sargassum sp.* dan *F. vasiculosus* mampu menghambat kanker paru-paru dan kulit. Aktivitas antitumor dari fukoidan dikaitkan dengan peningkatan yang signifikan dari aktivitas sitolitik sel *Natural Killer* (NK) ditambah produksi molekul sinyal respon imun yang dimediasi makrofag, yaitu Interleukin (IL)-2, IFN- $\gamma$ , dan IL-12, serta induksi apoptosis (Ale *et al.*, 2011).



**Gambar 2.3** Mekanisme Induksi Apoptosis Fukoidan (Satyarsa, 2019)

Fukoidan merupakan senyawa yang mampu menginduksi apoptosis.

Mekanisme Fukoidan dalam menginduksi apoptosis berdasarkan Amada (2009), menyebutkan bahwa penambahan fukoidan mampu meningkatkan jumlah kaspase 8, kaspase 9, kaspase 7, dan Bax secara signifikan yang berdampak langsung terhadap peningkatan apoptosis pada kultur sel MCF-7. Mekanisme apoptosis MCF-7 akibat penambahan fukoidan adalah fukoidan menginduksi akumulasi populasi pada siklus sub-G<sub>1</sub>, kondensasi kromatin, dan internukleosomal fragmentasi DNA. Dimana fitur tersebut merupakan representative dari apoptosis. Dimana caspase efektor seperti caspase-3 atau caspase 7 akan mengaktifkan DNase, menghasilkan fragmentasi DNA sebagai respon terhadap rangsangan apoptosis. Fukoidan sebagai senyawa antikanker mampu meningkatkan depolarisasi mitokondria dengan meningkatkan ekspresi protein pro-apoptosis Bax dan Bad, serta menurunkan regulasi ekspresi anti-apoptosis protein Bcl-2 dan Bcl-xl dalam sel MCF-7, sehingga sel MCF-7 akan mengalami apoptosis (Senthilkumar *et al.*, 2013).

Selain sebagai senyawa yang mampu menginduksi apoptosis, fukoidan memiliki kemampuan untuk menghambat proliferasi sel, hal ini berdasarkan penelitian Atashrazm *et al.* (2015), yang menyebutkan bahwa fukoidan mampu menurunkan regulasi cyclin D1, cyclin D2, dan CDK4 pada siklus sel kanker payudara. Dimana cyclin D1, cyclin D2, P53, dan CDK4 berperan dalam menginduksi Cell Cycle Arrest (CCA) yang merupakan metode kontrol sel untuk melanjutkan atau tidak proses pembelahan sel. Pada sel kanker, gen pengkode CCA ini seringkali mengalami mutasi yang menyebabkan terjadinya ekspresi berlebihan, sehingga pembelahan sel menjadi tidak terkontrol (Bower *et al.*, 2017).

Penurunan regulasi cyclin D1, cyclin D2, dan CDK4 menyebabkan siklus kanker

payudara terjadi peningkatan fase sub-G0/G1, sehingga terjadi penahanan atau keterlambatan fase G0/G1 pada proses proliferasi sel, sehingga proliferasi sel menjadi terhambat (Atashrazm *et al.*, 2015).

#### 2.4 Senyawa Antikanker

Senyawa antikanker merupakan senyawa yang digunakan untuk mencegah atau mengobati penyakit kanker. Senyawa antikanker dapat menghancurkan dan menyerang sel kanker dengan cara memicu proses apoptosis pada sel kanker, sehingga akan membuat sel kanker mengalami kematian. Selain menyebabkan apoptosis, senyawa antikanker juga dapat membuat sel kanker mengalami anti-proliferasi yaitu menghambat pertumbuhan sel kanker, sehingga tidak terjadi pertumbuhan yang abnormal (Pratama & Nuwarda, 2018). Senyawa antikanker yang sudah diteliti sebelumnya dan mampu menyebabkan apoptosis dan anti-proliferasi terdapat pada **Tabel 2.1**.

**Tabel 2.1** Bahan dan Senyawa Antikanker

No.	Bahan	Senyawa Antikanker	Sumber
1.	Daun dan kulit batang <i>Erythrina variegata</i> (dadap ayam)	Alkanoid, terpenoid, dan isoflavonoid	(Pratama & Nuwarda, 2018)
2.	Tanaman genus <i>Clerodendrum</i>	Steroid, terpenoid, flavonoid, konstituen volatil, glikosida cyanogenik, fenolik, karbohidrat, ribosome-inactivating protein, pheophorbide sitotoksik	(Chandra <i>et al.</i> , 2017)
3.	Tanaman lengkuas ( <i>Alpinia galanga</i> )	Flavonoid	(Ahlina <i>et al.</i> , 2020)
4.	Biji tanaman <i>Phaleria macrocarpa</i> (Scheff) Boerl (mahkota dewa)	Estradiol	(OR <i>et al.</i> , 2016)
5.	Kayu batang tumbuhan ndokulo ( <i>Kleinhovia hospital</i> L.)	Flavonol, kaemferol, kuersetin	(Pratama & Nuwarda, 2018)
6.	<i>Sargassum cinereum</i>	Fukoidan	(Narayani <i>et al.</i> , 2019)
7.	<i>Sargassum ilicifolium</i>	Fukoidan	(Al-Muqbali <i>et al.</i> , 2019)

## 2.5 Kanker

### 2.5.1 Pengertian Kanker

Kanker atau yang disebut juga neoplasma merupakan suatu penyakit yang ditandai dengan hilangnya kemampuan untuk mengontrol regulasi dari suatu sel maupun fungsi homeostatis sel pada suatu organisme multiseluler (Zafrial *et al.*, 2018). Hilangnya kemampuan regulasi sel, maka akan mengakibatkan sel mengalami proliferasi atau pengulangan siklus sel tanpa hambatan, sehingga akan terjadi pertumbuhan sel yang abnormal, tidak sensitif terhadap sinyal anti-pertumbuhan, serta kemampuan apoptosis yang menurun (Kurniasari, 2017; Lumbir & Banyumas, 2016). Kanker dapat berkembang dimana saja pada bagian tubuh makhluk hidup. Adanya kanker pada tubuh makhluk hidup, akan membuat tubuh sulit bekerja sebagaimana mestinya. Kanker sendiri terdapat berbagai macam jenis, antara lain sarkoma yaitu kanker yang tumbuh dari jaringan penyambung dan penyokong, karsinoma yaitu kanker yang tumbuh pada jaringan epitelial seperti kulit dan jaringan penyusun dinding organ, adenokarsinoma merupakan kanker yang tumbuh diberbagai organ tubuh, limfoma merupakan kanker yang tumbuh pada jaringan limpa (Hoadley *et al.*, 2018).

### 2.5.2 Kanker Payudara

Payudara terdiri dari jaringan kelenjar yang mencakup jaringan kelenjar susu, lemak, dan jaringan ikat. Selama kehamilan, kelenjar susu akan memproduksi dan mengeluarkan susu sebagai makanan untuk bayi. Namun, jika sel-sel di dalam kelenjar susu membelah diri dan berkembang secara tidak terkendali, sel-sel ini bisa berkembang menjadi tumor jinak ataupun ganas. Kanker payudara merupakan tumor ganas yang berkembang di dalam payudara (Kurniasari, 2017).

Gejala umum dari kanker payudara adalah adanya benjolan pada payudara yang dapat diraba dan biasanya semakin mengeras, tidak beraturan, serta dapat menimbulkan rasa nyeri. Gejala lain yang dapat dilihat antara lain, perubahan bentuk dan ukuran, kerutan pada kulit payudara, adanya cairan tidak normal berupa nanah, darah, cairan encer, atau air susu pada ibu tidak hamil atau tidak sedang menyusui yang keluar dari puting susu. Pada kanker payudara stadium lanjut, dapat timbul nyeri tulang, pembengkakan lengan, ulserasi kulit, atau penurunan berat badan (Kurniasari, 2017).

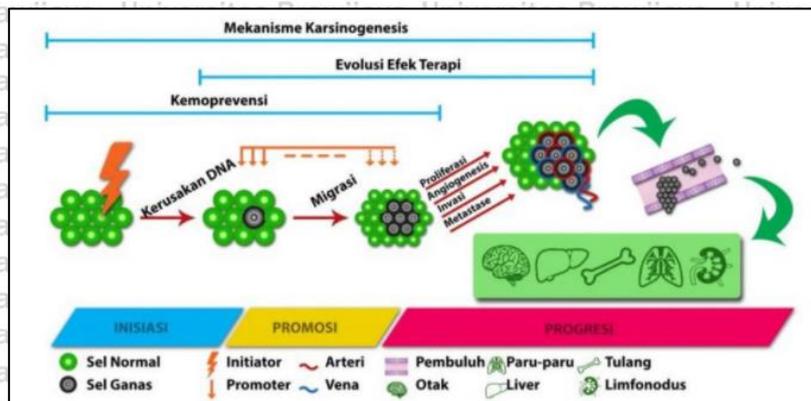
Berdasarkan data dari Sistem Informasi Rumah Sakit tahun 2010, kanker payudara adalah jenis kanker tertinggi pada pasien rawat jalan maupun rawat inap mencapai 12.014 orang (28,7%) (Kemenkes RI, 2019). Pada tahun 2013, lebih dari 60.000 orang didiagnosis kanker payudara di Indonesia. Walaupun prevalensi kejadian kanker payudara di Indonesia lebih rendah dari beberapa negara seperti Australia, Selandia Baru dan Jepang, tetapi angka mortalitas akibat penyakit ini di Indonesia lebih tinggi daripada negara-negara tersebut (Youlden *et al.*, 2014).

### 2.5.3 Penyebab Kanker

Faktor-faktor yang dapat menyebabkan kanker dikelompokkan dalam tiga bagian, yang pertama adalah karsinogen atau zat yang dapat memicu timbulnya kanker, dimana yang tergolong dalam karsinogen adalah virus, bahan kimia, dan radiasi. Kelompok kedua adalah gaya hidup yang kurang sehat, dimana contoh gaya hidup yang kurang sehat yang dapat menyebabkan kanker adalah obesitas, kurangnya mengonsumsi buah dan sayur, aktivitas fisik yang kurang, merokok, mengonsumsi alkohol, polusi udara, dan usia. Serta kelompok ketiga adalah faktor genetik atau keturunan (Kurniasari, 2017).

### 2.5.4 Mekanisme Kanker

Timbulnya kanker umumnya diawali dengan adanya kerusakan atau mutasi DNA. Kerusakan DNA ini apabila tidak dikendalikan atau dihambat akan berlangsung terus-menerus dan mengalami metastases sel DNA atau penggantian sel DNA. Jalur mutasi DNA yang mengarah pada perbanyakan sel yang tidak normal adalah hiperaktif gen – gen stimulator yaitu gen yang memicu timbulnya kanker mengalami peningkatan aktivitas dan inaktivasi gen – gen inhibitor yaitu gen yang menghambat pertumbuhan kanker mengalami penurunan aktivitas (Kurniasari, 2017). Gen yang mengalami mutasi dalam hal ini adalah gen p53. Gen p53 adalah gen pengkode tumor suppressor. Ketika terjadi kerusakan DNA, gen p53 akan menghambat sel untuk memasuki siklus sel selanjutnya, hal ini dimaksud untuk melakukan perbaikan kerusakan. Namun, apabila kerusakan sel tidak dapat diperbaiki, maka gen p53 akan memprogram untuk terjadinya apoptosis. Kanker atau tumor, progresi, dan resistensi dapat terjadi ketika gen p53 mengalami kerusakan atau mutasi sehingga terjadi pertumbuhan sel yang tidak terkontrol (Dharmayanti, 2003).



**Gambar 2. 4** Mekanisme Kanker (Kurniasari, 2017)

Mekanisme kanker terdiri dari tiga tahapan, yaitu (a) Tahap inisiasi merupakan terjadinya mutasi pada sel somatik normal menjadi sel yang abnormal dan berpotensi menjadi neoplastik/ sekumpulan sel abnormal. Tahap inisiasi dapat terjadi karena adanya mutasi gen seperti delesi, duplikasi, dan translokasi pada kromosom serta diakibatkan virus, bahan kimia reaktif, dan radikal bebas. (b) Tahap promosi merupakan tahapan awal bagi sel yang mengalami inisiasi dan akan membentuk klon dan melalui pembelahan. (c) Tahap progresif ditandai dengan perubahan genomik yang cepat dimana pertumbuhan sel mengarah pada keganasan jika tidak dihambat oleh lingkungan mikro di dalam sel (Kurniasari, 2017).

#### 2.5.5 Terapi Adjuvant pada Kanker Payudara

Terapi adjuvant adalah terapi tambahan yang ditambahkan selain terapi utama. Terapi adjuvant diberikan setelah dilakukan pembedahan atau operasi. Pembedahan atau operasi dan diikuti dengan terapi ini bertujuan untuk menghilangkan sel-sel kanker berukuran mikroskopik yang kemungkinan masih ada di dalam tubuh pasien, *Disease Free Survival (DFS)*, *Overall Survival (OS)*, menurunkan angka kejadian relaps atau kambuh, serta meningkatkan angka harapan hidup pasien kanker payudara stadium lokal hingga lanjut (Windrasari et al., 2019; Wulandari, 2012).

Contoh terapi adjuvant adalah terapi hormon. Dimana kerja hormonal terapi adjuvant adalah mencegah adanya pertumbuhan serta perkebangkan kanker payudara yang diduga akibat peran hormon esterogen yang mampu menyebabkan proliferasi sel kanker payudara. Obat terapi adjuvant hormonal seperti *Luteinizing Hormone Releasing Hormon (RHLH)*, *Selective Esterogen Modulator (SERM)*, dan

*Aromatase Inhibitor (AI)* (Windrasari *et al.*, 2019). Selain contoh terapi hormonal di atas, terapi adjuvant yang dapat diberikan adalah kemoterapi; terapi endokrin jangka Panjang; dan terapi radiasi (Gnant *et al.*, 2009; Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2019).

Pengaplikasian terapi adjuvant berdasarkan literatur Windrasari *et al.* (2019), yang melaksanakan penelitian terkait evaluasi terapi hormonal pada pasien kanker payudara stadium dini di kota Padang yang menjelaskan bahwa kejadian puncak kanker payudara pada usia 40-50 tahun dan risiko terkena kanker payudara meningkat seiring bertambahnya usia. Pemberian terapi hormonal yang diberikan pada pasien pramenopause adalah tamoxifen (58,3%), goserelin inj + tamoxifen (33,3%), dan goserelin inj (5,6%). Sedangkan, pada pasien pascamenopause terapi adjuvant yang diberikan AI (54,5%) dan tamoxifen (45,5%). Pemberian tamoxifen direkomendasikan pada terapi utama pada pasien kanker payudara dengan Esterogen (+). Berdasarkan penelitian tersebut didapatkan hasil pemberian tamoxifen tidak berpengaruh yang signifikan jika dimanfaatkan pada periode waktu yang pendek, namun manfaatnya signifikan jika pada tahun 7-9 hingga tahun 10-14. Serta angka kejadian relaps sebesar 22,4% dimana angka tersebut lebih kecil berdasarkan penelitian kejadian relaps di RS Sardjito, Yogyakarta yaitu sebesar 36,67%.

Penelitian lain terkait terapi adjuvant juga dilakukan oleh Gnant *et al.* (2009), yaitu mengetahui pengaruh penambahan asam zoledronate pada kombinasi goserelin dan tamoxifen atau goserelin dan anastrozole pada wanita premenopause penderita kanker payudara dini dengan esterogen responsif. Penelitian ini dilakukan pada 1083 pasien untuk menerima goserelin (3,6 gr selama 28 hari) + tamoxifen (20 mg per hari) atau anastrozole (1 mg per hari) dengan atau tanpa asam zoledronate (4 mg setiap 6 bulan) selama 3 tahun. Hasil dari penelitian ini adalah penambahan asam zoledronate meningkatkan *Disease Free Survival (DFS)*.

#### 2.5.6 Pengobatan Kanker yang Sudah Ada

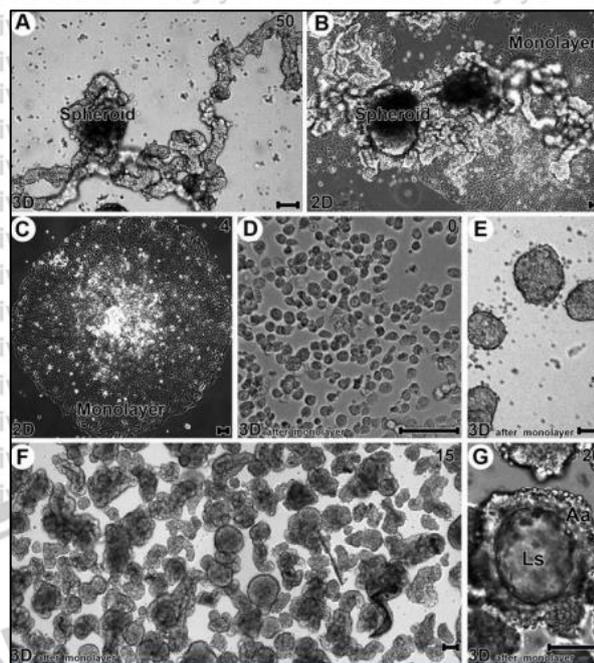
Pengobatan kanker yang sudah ada antara lain pembedahan atau operasi, kemoterapi atau pengobatan menggunakan zat-zat kimia yang diberikan baik secara oral; parental; atau lokal, imunoterapi adalah terapi yang memanfaatkan system imun dengan cara mengaktifkan atau menekan sistem imun, terapi hormon atau terapi endokrin adalah pengobatan kanker dengan memanfaatkan hormon yang umum digunakan untuk pengobatan kanker payudara, transplantasi sel induk

yaitu pengobatan dengan memanfaatkan sel punca, terapi radiasi yaitu menggunakan energi gelombang tinggi seperti X-ray; sinar gamma, electron; atau proton untuk menghancurkan sel kanker, hingga *nanomedicine* merupakan pengobatan kanker menggunakan material berukuran nano. Di Indonesia sendiri yang sering digunakan adalah pembedahan atau operasi sebagai penanganan pertama, kemudian dilakukan kemoterapi (Fitriatuzzakiyyah *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018), dimana terapi utama umumnya ditambah dengan terapi tambahan atau yang biasa disebut dengan terapi adjuvant (Wulandari, 2012).

## 2.5 MCF-7

*Cell line* atau kultur sel merupakan kunci untuk diagnosis secara molekuler karena dapat digunakan secara luas diberbagai aspek penelitian laboratorium, khususnya secara in-vitro. Salah satu contoh *cell line* adalah *Michigan Cancer Foundation-7* (MCF-7) merupakan *cell line* dari kanker payudara. Sel MCF-7 diperoleh dari jaringan epitel payudara dengan titik *metastasis pleural effusion breast adenocarcinoma* wanita berusia 69 tahun yang bergolongan darah O dengan Rhesus positif (Lee *et al.*, 2015).

Sel MCF-7 merupakan salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian secara *in-vitro* (Comşa *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2015). Hal ini dikarenakan sel MCF-7 mudah dikulturkan, stabil, dapat digunakan untuk studi Esterogen- $\alpha$ , serta mampu mempertahankan karakteristik epitel sel, sehingga karakteristiknya mirip dengan kanker payudara yang ada di dalam tubuh (Lee *et al.*, 2015). Sifat khusus dari sel MCF-7 adalah mampu mengekspresikan Esterogen- $\alpha$ . Selain itu juga mengekspresikan reseptor androgen progesterone, dan glukokortikoid yang menjadikan sel MCF-7 penting dalam penelitian medis. Pengobatan sel MCF-7 dengan esterogen telah terbukti memiliki efek anti-apoptosis serta pengobatan dengan obat kemoterapi (misalnya tamoxifen) dapat menghambat proliferasi sel dan menginduksi apoptosis (Huang *et al.*, 1997).



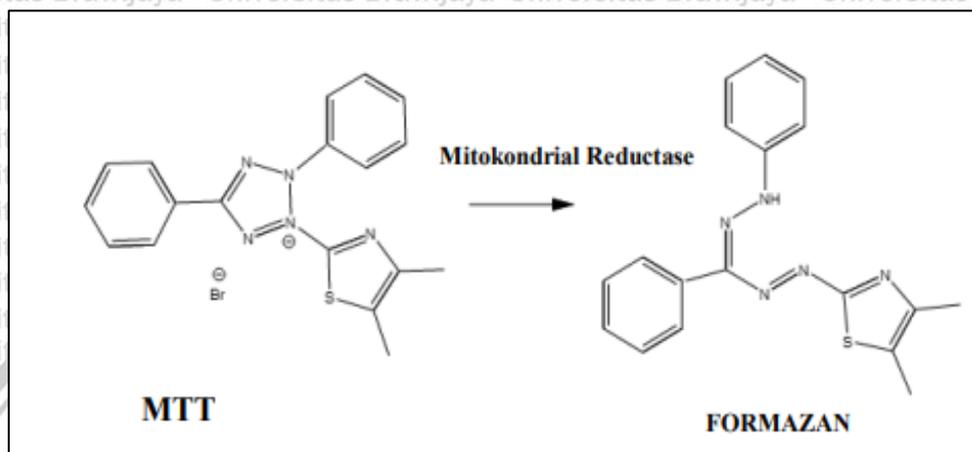
**Gambar 2.5** Cell line MCF-7 dalam Gambar 2D dan 3D (Do Amaral *et al.*, 2011)

Sel MCF-7 bersifat *adherent* atau melekat, sehingga metode kultur atau penumbuhan yang sesuai adalah monolayer. Media yang sering digunakan untuk pengkulturan sel MCF-7 adalah *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640), *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), atau *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) yang mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% untuk meningkatkan pertumbuhan sel dan antibiotik *Penicillin-Streptomycin* 1% untuk mencegah tumbuhnya kontaminan (Lee *et al.*, 2015). Pada penumbuhan sel MCF-7 perlu dilakukan penggantian media 2 kali dalam seminggu serta harus dilakukan subkultur setiap minggu pada 3 culture flask baru (Comşa *et al.*, 2015).

## 2.6 Uji Sitotoksik Metode MTT Assay

Uji sitotoksik merupakan uji yang dilakukan secara *in-vitro* menggunakan kultur sel untuk mengetahui toksisitas atau tingkat kemampuan suatu bahan dalam merusak organisme. Uji toksisitas secara *in-vitro* ini umumnya digunakan untuk uji pendahuluan dalam bidang farmasi, kosmetik, bahan tambahan pangan, serta pestisida. Metode uji sitotoksik yang umum digunakan adalah metode MTT Assay (Sitorus, 2013). MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) Assay merupakan metode yang umum digunakan untuk uji sitotoksik, yaitu untuk mengetahui sel-sel yang hidup dalam hasil yang banyak dan tanpa

perhitungan yang rumit. Penggunaan *MTT Assay* yang paling umum adalah menentukan sitotoksitas obat atau senyawa pada konsentrasi yang berbeda (Langdon, 2003). Uji sitotoksik metode *MTT Assay* sering digunakan karena metodenya sederhana, termasuk metode yang sensitif, semi otomatis, dan dapat untuk menghitung sampel yang banyak dalam satu waktu (Siregarr & Hadijono, 2000).



**Gambar 2.6** Prinsip Kerja Uji Sitotoksik Metode *MTT Assay* (Amalia, 2016)

Metode ini menggunakan *MTT* atau garam tetrazolium yang berwarna kuning, dimana garam tersebut akan dimetabolisme oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat pada mitokondria sel dan akan berubah menjadi kristal formazan berwarna ungu. Intensitas warna ungu yang terbentuk tersebut kemudian dibaca menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 550 nm. Intensitas warna yang dihasilkan akan berbanding lurus dengan jumlah sel yang aktif melakukan metabolisme (sel hidup) (Amir Hermansyah & Bambang Gonggo Murcito, 2017).

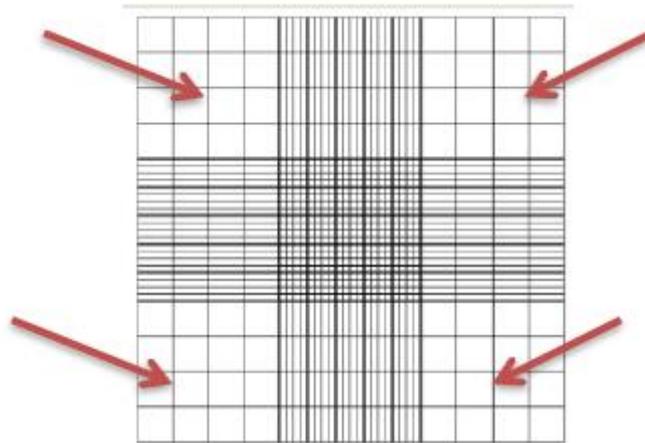
Pembacaan menggunakan *microplate reader* akan menghasilkan nilai absorbansi. Dari nilai absorbansi dihitung % viabilitas sel untuk mendapatkan nilai  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  merupakan salah satu parameter yang digunakan untuk uji sitotoksik atau *MTT assay*. Nilai  $IC_{50}$  merupakan nilai yang menggambarkan penghambatan sel sebesar 50% dari populasi yang ada. Nilai  $IC_{50}$  dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik, dari nilai  $IC_{50}$  juga dapat diketahui keefektifan dari suatu senyawa uji. Semakin besar nilai  $IC_{50}$  menunjukkan efektivitas dari senyawa uji yang rendah atau bersifat tidak toksik dan sebaliknya (Langdon, 2003).

**Tabel 2.2** Nilai IC<sub>50</sub> Senyawa-senyawa Antikanker terhadap Sel Kanker Payudara

No.	Senyawa Antikanker	Target	Nilai IC <sub>50</sub> (ppm)	Sumber
1.	Fukoidan dari <i>Padina sp.</i>	Cell line MCF-7	144	(Isnansetyo et al., 2017)
2.	Fukoidan dari <i>Turbinaria sp.</i>	Cell line MCF-7	663	(Isnansetyo et al., 2017)
3.	Fukoidan dari <i>Sargassum sp.</i>	Cell line MCF-7	461	(Isnansetyo et al., 2017)
4.	Fukoidan dari <i>Fucus vesiculosus</i>	Cell line MCF-7	200	(Janodien & Fatima, 2016)
5.	Fukoidan dari <i>U. pinnatifida</i>	Cell line MCF-7	200	(Lu et al., 2018)

## 2.7 Haemocytometer

Haemocytometer merupakan alat yang digunakan untuk perhitungan jumlah sel secara manual. Haemocytometer pertama kali digunakan untuk perhitungan sel darah dan kini pemanfaatannya semakin luas seperti menghitung jumlah mikroorganisme. Haemocytometer digunakan secara luas dikarenakan harganya yang terjangkau dan dapat digunakan untuk perhitungan berbagai macam jenis sel. Namun, penggunaan haemocytometer cukup memakan waktu karena dikerjakan secara manual dengan bantuan mikroskop dan penyebaran sel yang dihasilkan saat proses perhitungan bergantung pada keahlian dari analis, sehingga tidak sesuai jika diaplikasikan pada skala yang besar (Cadena-Herrera et al., 2015).



**Gambar 2.7** Kolom Haemocytometer (Roberts, *et al.*, 2000)

Jika dilihat menggunakan mikroskop, kolom haemocytometer akan terlihat seperti **Gambar 2.7** dimana terdiri dari 4 kuadran dan masing-masing kuadran terdiri dari 16 kotak. Sel yang dihitung dalam perhitungan jumlah sel adalah sel yang berada di dalam 16 kotak pada masing-masing kuadran. Untuk mendapat hasil yang akurat pada perhitungan jumlah sel menggunakan haemocytometer, perlu dilakukan suspensi atau homogenisasi sel secara merata sebelum dilakukan perhitungan. Pada penggunaan haemocytometer, jika jumlah sel yang terhitung >500 sel perlu dilakukan dilusi atau pengenceran untuk mengurangi jumlah sel, sedangkan jika jumlah sel yang terhitung <50 sel perlu ditambahkan kultur tanpa dilakukan pengenceran. Hal tersebut dilakukan untuk meningkatkan akurasi perhitungan (Piccinini *et al.*, 2017). Perhitungan jumlah sel menggunakan haemocytometer berdasarkan CCRC (2009) adalah sebagai berikut:

$$\text{Jumlah sel per mL} = \frac{n}{4} \times P \times 10^4$$

Keterangan:

n = jumlah sel dalam keempat bidang besar

4 = jumlah bilik pada haemocytometer yang dihitung

P = faktor pengenceran terhadap indikator warna

Penggunaan haemocytometer perlu ditambahkan trypan blue yang berfungsi sebagai pewarna untuk memudahkan visualisasi sel. Kombinasi antara trypan blue dan haemocytometer dianggap sebagai pendekatan standar dalam memperkirakan kepadatan sel yaitu jumlah total sel keseluruhan. Trypan blue pertama kali disintesis pada tahun 1904 oleh Paul Ehrlich dan digunakan pertama kali untuk analisis klinis sebelum menjadi standar penelitian dalam biologi. Trypan

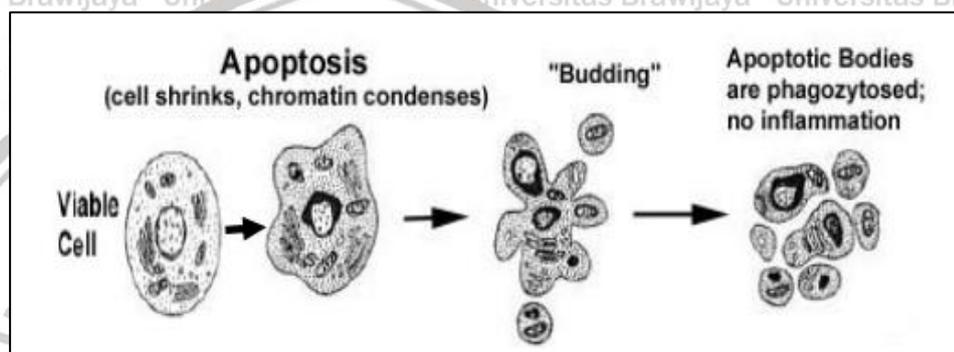
blue dapat melewati membrane sel pada sel yang mati yaitu sel yang mengalami apoptosis atau nekrosis, hal ini dikarenakan permeabilitas sel yang mati mengalami penurunan, sehingga ketika pembacaan jumlah sel hidup menggunakan haemocytometer yang dikombinasikan dengan trypan blue dapat dibedakan antara sel hidup dengan sel yang mati. Sel yang hidup ketika dilihat dibawah mikroskop akan berwarna bening dan berbentuk bulat, sedangkan sel yang mati akan berwarna biru gelap. Namun, penggunaan trypan blue juga memiliki kelemahan yaitu (a) dapat memberikan efek toksik pada sel jika terpapar pada waktu yang lama; (b) saat trypan blue dikombinasikan dengan protein seluler, memiliki potensi untuk mengikat sel non-spesifik terutama sel primer dalam uji klinis; (c) mampu terjadi positif palsu yaitu terdapat kerusakan pada sel namun membrane masih utuh; (d) masih belum ada konsentrasi trypan blue yang terstandarisasi untuk pengujian viabilitas sel; dan © perhitungan manual menggunakan haemocytometer dan mikroskop cahaya memerlukan waktu yang lama (Piccinini *et al.*, 2017).

Kesalahan yang mungkin terjadi ketika menggunakan haemocytometer yang dikombinasikan dengan trypan blue adalah (a) definisi yang subjektif dari sel, yaitu terdapat pedoman tetapi tidak ada aturan yang mendefinisikan sel dengan baik untuk membedakan antara sel dengan pengotor yang mampu mengecoh; (b) persepsi subjektif tentang sel mati dikarenakan tidak ada anmbang batas warna resmi untuk mendeskripsikan sel mati dan sel hidup; dan (c) kesalahan pipetian untuk homogenisasi sampel dan pengenceran akan mempengaruhi hasil (Piccinini *et al.*, 2017).

## 2.8 Apoptosis

Apoptosis atau proses kematian sel merupakan mekanisme kematian sel yang terkontrol yang mengarah pada penghapusan sel pada suatu jaringan. Apoptosis dianggap komponen yang vital dimana didalamnya terdapat berbagai macam proses seperti pergantian sel normal, pengembangan yang tepat, menunjukkan fungsi dari 20 sistem imun, kematian sel yang diinduksi oleh adanya bahan kimia, dll. Apoptosis merupakan respon yang umum terjadi dari sel multiseluler yang akan mengalami kematian. Proses apoptosis dapat terjadi karena adanya perbaikan proses siklus sel dan perbaikan sel yang rusak (Singh *et al.*, 2014).

Proses apoptosis umumnya terjadi dengan tujuan untuk menjaga homeostasis dari suatu jaringan dan melindungi organisme dengan cara menghilangkan atau meyingkirkan bagian yang rusak atau terinfeksi. Proses apoptosis berjalan dengan cepat, yaitu 20 kali lebih cepat dari proses mitosis. Oleh karena itu, penampakan proses apoptosis sel secara in-vivo jarang ditemukan dan sel yang mengalami apoptosis akan dimakan oleh sel yang berada didekatnya, sehingga tidak terdapat jejak yang tersisa (Sharma *et al.*, 2014). Terjadinya proses apoptosis dari suatu sel membutuhkan kerja sama dari serangkaian molekul, seperti molekul sinyal, reseptor, enzim, dan protein pengatur gen (Sharma *et al.*, 2014).



**Gambar 2.8** Proses Apoptosis (Sharma *et al.*, 2014).

Morfologi dari sel yang mengalami apoptosis adalah terjadinya fragmentasi kromatin dan kondensasi nuklear pada inti sel serta diikuti dengan berkurangnya volume sel (piknosis). Tahap awal apoptosis terjadi perpecahan kromatin, namun membrane sel masih utuh (karioheksis). Tahap akhir apoptosis terjadi penonjolan membran, modifikasi ultrastruktural organel pada sitoplasma, dan hilangnya integritas membran sehingga terjadi fragmentasi (Sari, 2018).

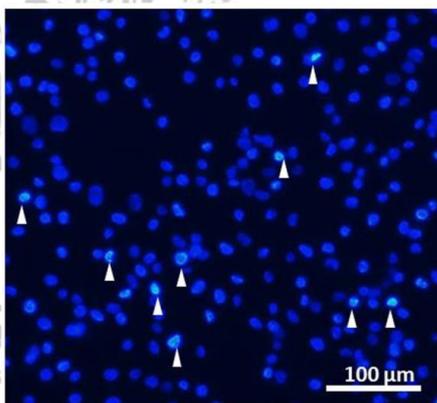
Proses apoptosis dapat diinduksi dengan penambahan ekstrak alam pada sel target. Berdasarkan penelitian Hu *et al.* (2002), yang melaksanakan penelitian terkait ekstrak *Ganoderma Lucidum* yang mampu menginduksi proses apoptosis sel MCF-7 menunjukkan hasil bahwa penambahan ekstrak *Ganoderma Lucidum* sebanyak 500 ppm mampu menginduksi apoptosis pada sel MCF-7 dengan cara yang bergantung pada waktu (12, 24, 36, 48 jam), yang ditandai dengan penyusutan inti, kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA yang signifikan. Efek yang paling signifikan diamati 36 jam setelah pengujian. Penelitian tentang uji apoptosis juga dilakukan oleh Chaouki *et al.* (2009), yaitu memanfaatkan Sitral yang merupakan komponen utama dalam minyak kulit buah jeruk untuk

menginduksi apoptosis sel MCF-7 dengan 2 variasi konsentrasi ekstrak yaitu  $10 \times 10^{-5}$  dan  $10 \times 10^{-5}$  M menunjukkan hasil peningkatan apoptosis masing-masing sebesar 2,22 dan 4,16 kali dibandingkan dengan kontrol, sehingga sitral termasuk senyawa yang mampu menginduksi apoptosis pada sel MCF-7.

## 2.9 Metode Pewarnaan Hoechst 33342

Pewarna Hoechst 33342 (2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride trihydrate) merupakan pewarna DNA pada sel yang tereksitasi oleh sinar ultraviolet dan akan memancarkan fluoresensi berwarna biru dengan panjang gelombang 460 – 490 nm (Perumalsamy *et al.*, 2017). Pada sel uji, Hoechst 33342 akan mengikat pada basa nitrogen adenin-timin (A-T). Hoechst 33342 digunakan secara khusus untuk mewarnai inti sel (Pérez *et al.*, 2017).

Ada banyak daftar metode yang dapat digunakan untuk melabeli DNA atau genome spesifik pada sel hidup atau sel mati. Namun, pewarnaan sel dengan pewarna fluoresen biru spesifik DNA DAPI dan Hoechst menjadi metode yang banyak digunakan karena pengaplikasiannya yang sederhana, biaya rendah, dan tidak ada persyaratan untuk modifikasi genetik. Selain hal tersebut, Hoechst banyak digunakan karena mampu membuat sel lebih permeable dan toksisitas yang rendah terhadap sel (Bucevič & Lukinavič, 2018).



**Gambar 2.9** Sel MCF-7 yang diberi pewarna Hoechst 33342 (Chantree, *et al.*, 2021).

Salah satu aplikasi dari pewarna Hoechst 33342 adalah membedakan kondisi sel setelah diberi perlakuan sampel uji. Berdasarkan warna yang dihasilkan, akan mampu membedakan sel hidup dan sel yang mengalami apoptosis. Sel yang mengalami apoptosis akan mengalami peningkatan

permeabilitas dinding sel oleh sebab itu, pewarna Hoechst dapat melewati dinding sel dan berikatan dengan basa nitrogen A-T sehingga, menghasilkan fluoresen berwarna biru. Instrumen yang dapat digunakan untuk pembacaan pewarnaan Hoechst 33342 adalah mikroskop fluorescence, flowcytometer, dll (Pérez *et al.*, 2017).

### 2.10 Hipotesis

Diduga ekstrak fukoidan dari *Sargassum cristaefolium* memiliki aktivitas antikanker yang dibuktikan dengan uji sitotoksik dan mampu mempengaruhi jumlah sel hidup dan proses apoptosis pada *cell line* MCF-7 secara *in-vitro*.



## BAB III. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Kegiatan penelitian dilaksanakan pada bulan Februari – Mei 2021 dan bertempat di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya serta Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.

### 3.2 Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *microplate reader* (Spectrostar nano), *haemocytometer* (Neubauer), *counter*, mikroskop inverted (Olympus IX71), Mikroskop fluorescence (Olympus IX71 ISO 200 70MS), vortex, inkubator CO<sub>2</sub> (Thermo Fisher Scientific HERACELL 1501), sentrifuge (LW Scientific), *Laminar Air Flow* (LAF) (Thermo Scientific HERASAFE KS), mikropipet 1000 µL; 200 µL; dan 50 µL (VITLAB; SOCOREX), mikrotube, conical tube 15 mL (SPL), conical tube 50 mL (Gama Biotek), *96 well plate* (Costar), *24 well plate* (SPL), labu ukur 250 mL (Iwaki), beaker glass (Iwaki), *culture flask* T25 (SPL), vial, oven, *waterbath* (AquaBath), *magnetic stirrer* (Cimarec), autoclave (TOMY), timbangan analitik, spuit 10 mL (Onemed), filter membrane ukuran 0,22 µm (Minisart), botol schott 100 dan 250 mL (Duran), pinset, cawan petri diameter 6 cm (Pyrex), cover slip, object glass (Sail Brand), kulkas 4°C dan 20°C (Samsung), Mr. Froze (Nalgene), serta *deep freezer* -80°C (By Bio).

#### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain ekstrak fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium* yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH), Fukoidan komersial yang berasal dari *Fucus vasiculosus* dibeli dari Sigma-Aldrich Amerika Serikat, *cell line* MCF-7 yang diperoleh dari Laboratorium Aretha Medika Utama *Biomolucular and Biomedical Research Center* Bandung, media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) (Gibco), *Phosphate Buffered Salina* (PBS), 10% *Fetal Bovine Serum South Africa South Africa* (FBS SA) (Gibco), Penicillium-streptomisin, NaHCO<sub>3</sub>, Trypsin-EDTA 5%, [3-(4,5 dimetiliazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolium bromide] MTT, Trypan Blue Stain 0,4%, dan Dimetil Sulfoksida (DMSO) (Merck), *sterile water* (Widatra Bhakti),

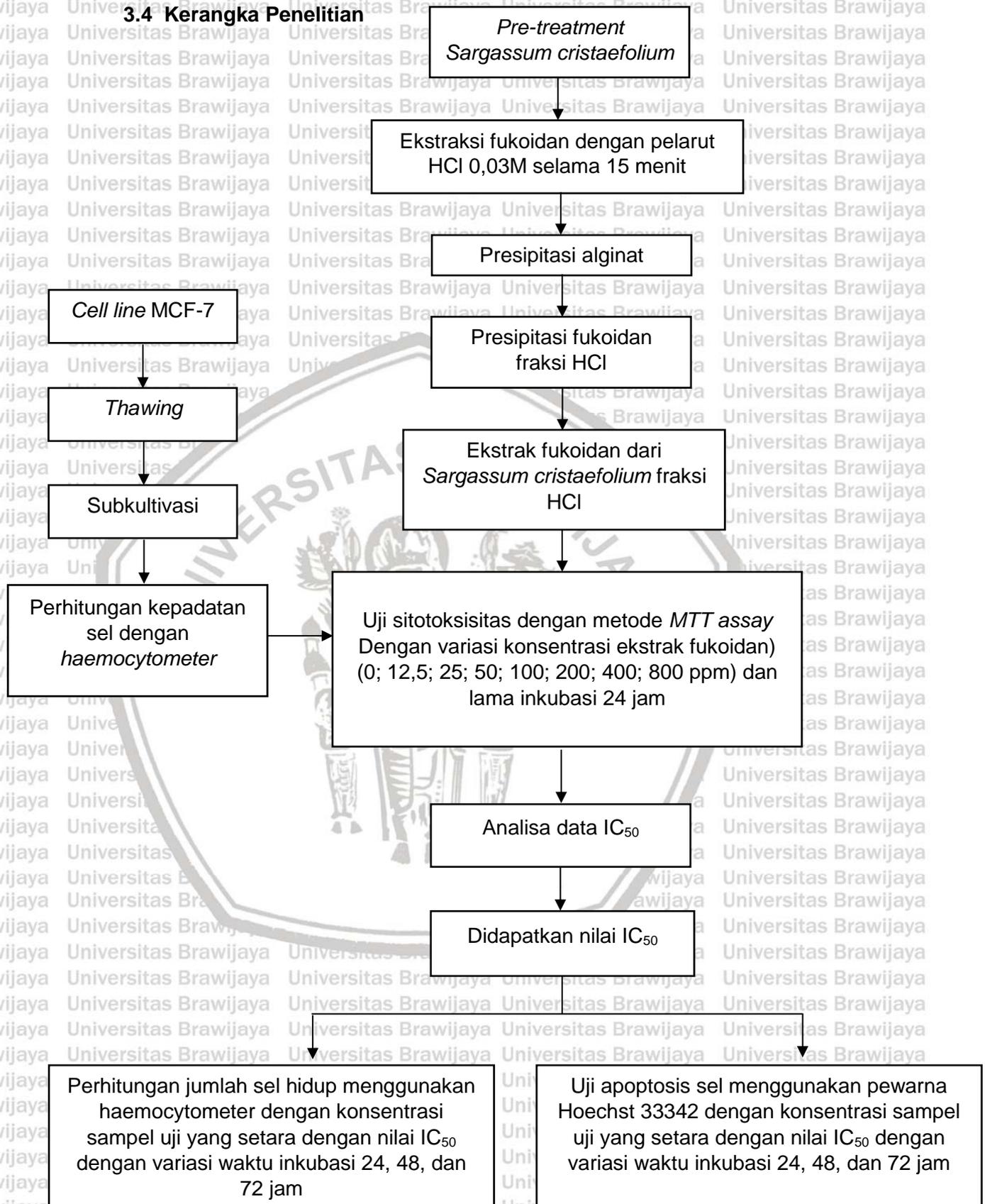
alkohol 70%, aluminium foil, mounting, pewarna Hoechst 33342 (Thermo Scientific), serta DPBS.

### 3.3. Metode

Penelitian uji aktivitas senyawa antikanker ekstrak fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium* pada *cell line* MCF-7 secara *in-vitro* dilakukan dengan metode eksperimental di laboratorium dan studi literatur untuk membandingkan hasil penelitian yang didapatkan. Metode penelitian ini terdiri dari 3 tahapan, yaitu:

1. Penentuan nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak fukoidan fraksi HCl dengan 7 variasi konsentrasi ekstrak yaitu: 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; dan 800 ppm dengan lama waktu inkubasi 24 jam. Nilai  $IC_{50}$  ekstrak fukoidan fraksi HCl dibandingkan dengan kontrol positif yaitu ekstrak fukoidan komersial yang berasal dari *Fucus vasiculosus* menggunakan uji *Pired T-test* 3 kali pengulangan.
2. Pengujian pengaruh lama waktu inkubasi (24, 48, dan 72 jam) terhadap apoptosis sel MCF-7 dengan penambahan ekstrak fukoidan yang setara dengan nilai  $IC_{50}$ .
3. Pengujian pengaruh waktu inkubasi terhadap viabilitas sel MCF-7 dengan penambahan ekstrak fukoidan yang setara nilai  $IC_{50}$ . Pada pengujian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor dengan 3 level variasi waktu inkubasi yaitu 24, 48, dan 72 jam dan 3 kali pengulangan.

### 3.4 Kerangka Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Penelitian

### 3.5 Pelaksanaan

Pelaksanaan penelitian yang akan dilakukan terdiri dari 2 tahapan utama, yakni persiapan yang terdiri dari pembuatan media kultur, penumbuhan kultur *cell line* MCF-7, perhitungan jumlah sel, serta pengujian aktivitas senyawa antikanker fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium* terhadap *cell line* MCF-7 secara *in-vitro*. Adapun pengujian yang akan dilakukan adalah pengujian IC<sub>50</sub>, uji apoptosis *cell line* MCF-7 menggunakan pewarna Hoechst 33342, dan pengujian perhitungan jumlah sel hidup menggunakan haemocytometer. Penjelasan dari masing-masing tahapan adalah sebagai berikut:

#### 3.5.1 Tahap Persiapan

##### 1. Ekstraksi Fukoidan Fraksi HCl

Adapun tahapan-tahapan dalam ekstraksi fukoidan yang pertama adalah *pre-treatment*. *S. cristaefolium* dicuci dengan air tawar kemudian dikeringkan dengan cara dijemur selama 3 hari. Setelah itu, digiling menggunakan *grinder* dan diayak menggunakan ayakan berukuran 60 mesh. Kemudian, didapatkan bubuk *S. cristaefolium* dan ditambahkan pelarut metanol : kloroform (2:1 v/v) dan dihomogenisasi dengan *magnetic stirrer* selama 20 menit. Kemudian, disentrifugasi dengan kecepatan 2.500 rpm selama 20 menit dan disaring dengan kertas saring whatman No. 1.

Tahapan kedua adalah ekstraksi fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium*. Bubuk *S. cristaefolium* sebanyak 10 gram ditambahkan pelarut dengan rasio bahan : pelarut (1:20). Konsentrasi pelarut HCl yang ditambahkan adalah 0,03 M dengan lama waktu ekstraksi 15 menit. Kemudian, dimasukkan pada gelas beaker 250 mL dan diekstraksi pada Ultrasonic Bath pada frekuensi 40KHz. Setelah itu, disaring menggunakan kertas saring whatman No. 1. Kemudian, yang digunakan untuk tahap selanjutnya adalah filtrat.

Tahapan ketiga adalah presipitasi alginat yang memiliki tujuan untuk memisahkan alginat dari ekstrak fukoidan. Filtrat fraksi HCl yang dihasilkan ditambahkan CaCl<sub>2</sub> 1% sejumlah volume filtrat, kemudian disimpan pada suhu 4°C. setelah itu, disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. kemudian, disaring dengan kertas saring whatman No. 1 dan didapatkan filtrat II fraksi HCl.

Tahap keempat adalah presipitasi fukoidan. Filtrat II fraksi HCl ditambahkan etanol 96% sebanyak 2x volume filtrat, kemudian disimpan pada suhu 4°C selama 8 jam. Setelah itu disentrifugasi pada kecepatan 8000

rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. kemudian residu yang digunakan, sedangkan filtrat dibuang. Residu yang dihasilkan dicuci dengan etanol 96% dan aseton 99,5%. Kemudian, dikeringkan pada suhu 35°C pada *cabinet dryer*. Setelah itu, digerus dan disimpan pada wadah tertutup dan didapatkan ekstrak fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium*.

## 2. Pembuatan Media Kultur Lengkap RPMI 50 mL (Modifikasi dari CCRC, (2009)).

Adapun tahapan-tahapan dalam proses pembuatan media kultur adalah menyiapkan RPMI bubuk sebanyak 1 sachet untuk dilarutkan pada 1000 mL *sterile water* dan ditambah dengan NaHCO<sub>3</sub> sebanyak 2 gram. Pelarutan dilakukan menggunakan *magnetic stirrer* untuk mempercepat proses pelarutan. Setelah RPMI larut, kemudian dilakukan filtrasi menggunakan spuit 10 mL dan filter membrane ukuran 0,22 µm untuk memisahkan rendemen dan kontaminan yang tidak terlarut. Setelah itu, menyiapkan 0,5 mL penisilin-streptomisin 1%, 5 mL FBS SA 10%, dan 44,5 mL media RPMI cair. Kemudian FBS SA dan penisilin-streptomisin dicairkan pada suhu kamar, jika sudah dalam keadaan cair dilakukan *thawing* agar suhu sesuai dengan suhu ruang. Kemudian siapkan *conical tube* dengan volume 50 mL dan diambil FBS sebanyak 5 mL untuk dimasukkan dalam *conical tube*. Kemudian diambil 0,5 mL penisilin-streptomisin 1% dan dimasukkan pada *conical tube*. Kemudian ditambahkan media RPMI hingga volume akhir 50 mL. Setelah itu, dilakukan homogenisasi. Setelah media homogen dilakukan filtrasi menggunakan spuit 10 mL dan filter membrane ukuran 0,22 µm serta media kultur lengkap RPMI diletakkan pada botol schott duran 100 mL. Kemudian, diberi label nama media dan tanggal pembuatan. Penyimpanan media kultur lengkap RPMI pada kulkas 4°C. Proses pembuatan media kultur harus dilakukan dengan aseptis untuk mencegah adanya kontaminasi. Metode ini terdapat modifikasi yaitu media kultur yang digunakan adalah RPMI sedangkan pada CCRC (2009), menggunakan media kultur Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) serta pada penelitian ini tidak dilakukan *ajust* pH dikarenakan telah terdapat larutan buffer yaitu NaHCO<sub>3</sub>.

### 3. Penumbuhan Sel MCF-7 (Modifikasi dari CCRC (2009)).

Tahapan-tahapan dalam proses penumbuhan sel adalah disiapkan kultur sel MCF-7 yang disimpan pada cryotube dan media kultur lengkap RPMI. Cryotube diambil dari *deep freezer* -80°C kemudian dilakukan *thawing* pada suhu kamar selama 15 menit (hingga mencair). Kemudian diambil suspensi sel sebanyak 1000 µL dan dimasukkan pada conical tube 15 mL. Kemudian, ditambahkan media kultur lengkap RPMI hingga volume akhir 6 mL. Setelah itu, disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 5 menit, supernatan yang dihasilkan dibuang dan semua pelet yang dihasilkan ditambahkan dengan media kultur sebanyak 1 mL. Kemudian disuspensi dengan cara dipipetting hingga homogen yang ditandai dengan tidak adanya endapan pada dasar conical. Kemudian semua hasil suspensi ditransfer pada 2 *culture flask* berukuran T25, masing-masing *culture flask* ditransfer sebanyak 0,5 mL. Setelah itu, ditambahkan 4 mL media kultur lengkap RPMI. Kemudian, diamati kondisi sel menggunakan mikroskop inverted. Kemudian, diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub>. Jika kondisi sel sudah siap, ditandai dengan 70-80% konfluen (homogen monolayer) segera dilakukan pengujian. Proses penumbuhan sel MCF-7 dilakukan di dalam LAF dan selalu mengupayakan kondisi steril untuk mencegah adanya kontaminasi. Metode ini terdapat modifikasi yaitu volume penambahan media kultur lengkap RPMI, pada CCRC (2009), menggunakan volume media 5 mL, sedangkan pada penelitian ini menggunakan volume 4 mL agar media kultur tidak mencapai mulut *culture flask*, sehingga dapat mengurangi adanya kontaminasi.

### 4. Penggantian Media Sel MCF-7 (Modifikasi dari CCRC (2009)).

Penggantian media dilakukan ketika media telah mengalami perubahan warna dari merah muda menjadi orange yaitu 3 hari sekali. Tujuan penggantian media ini untuk menambah nutrisi yang akan menunjang pertumbuhan sel MCF-7. Bahan-bahan yang perlu disiapkan adalah media kultur lengkap RPMI dan PBS (opsional). Tahapan-tahapan yang dilakukan untuk pergantian media adalah mengeluarkan *culture flask* dari inkubator CO<sub>2</sub>. Kemudian, mengeluarkan media lama dari dalam *culture flask* menggunakan spuit 10 mL. Kemudian, dimasukkan media baru sebanyak 4 mL menggunakan spuit 10 mL baru dan filter membrane ukuran 0,22 µm. Setelah itu, *culture flask* dikembalikan pada inkubator CO<sub>2</sub>. Penggantian

media memerlukan PBS ketika media yang akan diganti tidak hanya mengalami perubahan warna tetapi sudah keruh. Tahapan prosesnya adalah mengeluarkan *culture flask* dari inkubator CO<sub>2</sub>. Kemudian, mengeluarkan media lama dari dalam *culture flask* menggunakan spuit 10 mL. Setelah itu, ditambahkan PBS sebanyak 5 mL menggunakan spuit 10 mL baru dan filter membrane ukuran 0,22 µm. Kemudian, *culture flask* digoyang untuk meratakan PBS. Setelah itu, dikeluarkan PBS menggunakan spuit pembuangan. Kemudian, dimasukkan media baru sebanyak 4 mL menggunakan spuit 10 mL dan filter membrane ukuran 0,22 µm. Setelah itu, *culture flask* dikembalikan pada inkubator CO<sub>2</sub>. Proses penggantian media dilakukan di dalam LAF. Metode ini terdapat modifikasi yaitu volume penambahan media kultur lengkap RPMI, pada CCRC (2009), menggunakan volume media 5 mL, sedangkan pada penelitian ini menggunakan volume 4 mL agar media kultur tidak mencapai mulut *culture flask*, sehingga dapat mengurangi adanya kontaminasi. Serta alat yang digunakan untuk mengeluarkan media lama dimana pada CCRC (2009), menggunakan pipet Pasteur dan pada penelitian ini menggunakan spuit 10 mL.

#### 5. Pemanenan Sel MCF-7 (Modifikasi dari CCRC (2009)).

Pemanenan sel MCF-7 dilakukan ketika kondisi sel sudah konfluen 70-80%. Adapun bahan-bahan yang dibutuhkan dalam pemanenan sel adalah PBS yang berfungsi untuk mencuci sel, tripsin-EDTA yang berfungsi untuk mengurangi perekatan sel pada *culture flask*, dan media kultur lengkap RPMI sebagai stopper tripsin-EDTA dan sebagai media pertumbuhan. Tahapan-tahapan pemanenan sel MCF-7 adalah mengeluarkan sel dari inkubator CO<sub>2</sub>. Kemudian, dibuang media menggunakan spuit 10 mL (spuit pembuangan), kemudian sel dicuci menggunakan PBS sebanyak 4 mL sebanyak 2x ulangan, setiap pencucian dilakukan penggoyangan agar PBS mengenai seluruh sel. Setelah proses pencucian selesai, kemudian ditambahkan dengan tripsin-EDTA sebanyak 1,5 mL selama 2 menit, kemudian dimasukkan ke dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Ketika waktu pemberian tripsin-EDTA kurang 30 detik, *culture flask* dikeluarkan dari inkubator CO<sub>2</sub> dan diamati di bawah mikroskop inverted untuk melihat apakah sel sudah terlepas dari dinding *culture flask*. Setelah itu, ditambahkan dengan media

kultur lengkap RPMI dengan cepat sebanyak 5 mL. Kemudian, dilakukan pipetting untuk membantu sel lepas dari dinding *culture flask*, jika viskositas dari media sudah meningkat (lebih kental) dapat diartikan bahwa sel sudah terlepas. Kemudian, media dipindahkan ke conical tube 15 mL menggunakan pipet. Lalu, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit. Setelah itu, supernatant dibuang dan pellet yang didapatkan merupakan sel hasil panen. Tahap selanjutnya adalah tahap perbanyakkan sel (subkultur) atau tahap pengujian. Dalam proses ini setiap pembuangan bahan menggunakan spuit 10 mL (spuit pembuangan) dan menambahkan bahan-bahan menggunakan spuit 10 mL yang dilengkapi dengan filter membrane ukuran 0,22  $\mu\text{m}$  untuk mencegah adanya kontaminasi serta proses ini dilakukan secara steril di dalam LAF. Metode ini terdapat modifikasi yaitu lama waktu pemberian tripsin-EDTA, dimana pada CCRC (2009), selama 3 menit sedangkan pada penelitian ini selama 2 menit. Hal ini dikarenakan pada waktu 2 menit sudah mampu membuat sel terlepas dan jika waktu pemberian terlalu lama dapat merusak sel. Serta alat yang digunakan untuk mengeluarkan media lama dimana pada CCRC (2009), menggunakan pipet Pasteur dan pada penelitian ini menggunakan spuit 10 mL.

#### 6. Tahap Perbanyakkan Sel atau Subkultur (Modifikasi dari CCRC (2009)).

Tahap perbanyakkan sel dilakukan dengan tujuan memperbanyak stok sel sebelum dilakukan pengujian. Tahapan-tahapan subkultur adalah setelah didapat pellet dari proses pemanenan sel (point 4 dalam tahap persiapan) kemudian ditambahkan media kultur lengkap RPMI sebanyak 2 mL dan dilakukan homogenisasi dengan cara dipipetting, homogen ditandai dengan sudah tidak adanya endapan pada conical tube. Kemudian, disiapkan 2 *culture flask* baru, masing-masing *culture flask* ditambahkan media kultur lengkap RPMI sebanyak 3 mL dan media dengan sel sebanyak 1 mL yang berasal dari conical tube sebelumnya. Kemudian diamati kondisi sel dibawah mikroskop inverted dan *culture flask* disimpan di dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Dalam proses ini setiap pembuangan bahan menggunakan spuit 10 mL (spuit pembuangan) dan menambahkan bahan-bahan menggunakan spuit 10 mL yang dilengkapi dengan filter membrane ukuran 0,22  $\mu\text{m}$  untuk mencegah adanya kontaminasi serta proses ini dilakukan

secara steril di dalam LAF. Metode ini terdapat modifikasi yaitu volume penambahan media kultur lengkap RPMI, pada CCRC (2009), menggunakan volume media 5 mL, sedangkan pada penelitian ini menggunakan volume 4 mL agar media kultur tidak mencapai mulut culture flask, sehingga dapat mengurangi adanya kontaminasi. Serta alat yang digunakan untuk mengeluarkan media lama dimana pada CCRC (2009), menggunakan pipet Pasteur dan pada penelitian ini menggunakan spuit 10 mL.

#### 7. Perhitungan Jumlah Sel untuk Platting atau Penanaman Sel MCF-7 pada Wellplate (Modifikasi dari CCRC (2009)).

Adapun tahapan-tahapan pemanenan dan perhitungan jumlah sel adalah setelah didapat pellet dari proses pemanenan sel (point 4 dalam tahap persiapan) kemudian ditambahkan media kultur lengkap RPMI hingga volume akhir 1 mL. Setelah itu, kultur sel dihomogenkan dengan cara dipipetting dan diambil kultur sel sebanyak 10  $\mu$ L lalu ditambahkan dengan trypan blue sebanyak 10  $\mu$ L dan dihomogenisasi. Kemudian dipindahkan pada haemocytometer dan dilakukan perhitungan jumlah sel dengan bantuan mikroskop inverted. Metode ini terdapat modifikasi yaitu dimana pada CCRC (2009), tidak terdapat penambahan trypan blue sebagai pewarna untuk membedakan sel hidup dan sel mati, sedangkan pada penelitian ini terdapat penambahan trypan blue.

Jumlah sel dihitung dengan rumus:

$$\text{Jumlah sel per mL} = \frac{n}{4} \times P \times 10^4$$

Keterangan:

n = jumlah sel dalam keempat bidang besar

4 = jumlah bilik pada haemocytometer yang dihitung

P = faktor pengenceran terhadap indikator warna

#### 8. Platting atau Penanaman Sel MCF-7 pada Wellplate (Modifikasi dari CCRC (2014)).

Penanaman sel dilakukan pada 2 macam wellplate, yaitu wellplate 96 dan wellplate 24. Wellplate 96 well untuk uji IC<sub>50</sub> dan perhitungan jumlah sel dengan haemocytometer, sedangkan untuk pengujian apoptosis dengan

metode Hoechst 33342 menggunakan wellplate 24. Platting dapat dilakukan jika perhitungan jumlah sel menggunakan haemocytometer telah selesai dilakukan. Pada umumnya jumlah sel tiap well pada wellplate 96 adalah 10.000 sel/mL dan untuk setiap well pada wellplate 24 adalah 30.000 sel/mL.

Penambahkan media kultur lengkap RPMI yang telah bercampur dengan sel pada wellplate 96 adalah 100  $\mu$ L/well, sedangkan untuk wellplate 24 adalah 300  $\mu$ L/well. Setelah proses platting selesai, wellplate disimpan dalam inkubator CO<sub>2</sub> dan sel siap dilakukan pengujian jika telah konfluen 70-80% (2 hari). Proses platting dilakukan di dalam LAF dengan keadaan steril. Metode ini terdapat modifikasi yaitu dimana pada CCRC (2014), setelah platting, lama waktu menunggu sel hingga konfluen yaitu selama 1 hari sedangkan pada penelitian ini selama 2 hari. Hal ini dikarenakan pada waktu 1 hari, sel belum konfluen 70-80%.

#### 9. Pembuatan Larutan Sampel Fukoidan (Modifikasi dari CCRC (2009)).

Ekstrak fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium* berasal dari koleksi Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH). Diagram alir ekstraksi fukoidan terdapat pada **Lampiran 1, halaman 62**. Adapun tahapan-tahapan pembuatan sampel uji adalah ditimbang ekstrak fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium* sebanyak 10 mg kemudian dipindahkan pada conical tube 15 mL dan ditambahkan sterile water sebanyak 5 mL sehingga, didapatkan konsentrasi larutan stok fukoidan 2000 ppm. Setelah itu, divortex untuk melarutkan ekstrak fukoidan. Setelah didapatkan larutan stok, untuk pengujian dibuat sampel uji dengan konsentrasi 800 ppm; 400 ppm; 200 ppm; 100 ppm; 50 ppm; 25 ppm; dan 12,5 ppm dengan pengenceran bertingkat menggunakan media kultur lengkap RPMI sebagai pelarut. Perhitungan pengenceran dapat dilihat pada **Lampiran 2, halaman 75**. Metode ini terdapat modifikasi yaitu dimana pada CCRC (2009), pelarut yang digunakan adalah DMSO, sedangkan pada penelitian ini menggunakan sterile water. Hal ini dikarenakan fukoidan tidak dapat larut pada DMSO.

#### 10. Pembekuan Sel MCF-7 (Modifikasi dari CCRC (2009)).

Pembekuan sel berfungsi untuk menyimpan sel dalam jangka waktu yang lama. Tahapan-tahapan yang dilakukan adalah mempersiapkan media pembekuan sel yang terdiri dari DMSO 20%, FBS 20%, dan media kultur

lengkap RPMI ditambahkan hingga volume akhir 4 mL. Setelah itu, dilakukan proses pemanenan sel seperti point 4 pada tahap persiapan. Ketika telah didapatkan pellet dari proses pemanenan sel, kemudian ditambahkan media pembekuan dan dihomogenisasi dengan cara dipipetting. Setelah homogen, dimasukkan pada vial pembekuan sebanyak 1 – 1,5 mL pada masing-masing vial pembekuan. Kemudian diberi label nama sel dan tanggal. Setelah itu, disimpan pada Mr. Froze selama minimal 24 jam untuk membentuk kristal es yang berukuran kecil, jika sudah 24 jam atau lebih kemudian dikeluarkan dari Mr. Froze dan disimpan pada toples serta diletakkan pada *deep freezer* bersuhu  $-80^{\circ}\text{C}$ . Metode ini terdapat modifikasi yaitu dimana pada CCRC (2009), media pembekuan menggunakan perbandingan DMSO:media kultur (9:1 v/v), sedangkan pada penelitian ini menggunakan DMSO:FBS:media kultur (2:2:6 v/v). Selain itu pada CCRC (2009), setelah suspensi sel ditrasfer pada cryo tube kemudian disimpan pada *deep freezer* suhu  $20^{\circ}\text{C}$ , sedangkan pada penelitian ini setelah suspensi sel ditrasfer pada cryo tube kemudian disimpan pada Mr. Froze dengan penurunan suhu  $-1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$  selama 24 jam yang bertujuan untuk membentuk kristal es yang berukuran kecil untuk merusak membran sel dan setelah 24 jam, kemudian disimpan pada *deep freezer* bersuhu  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5.2 Tahap Pengujian

1. Pengujian Sitotoksik dengan MTT Assay (Modifikasi dari Sitorus (2013) dan CCRC (2009)).

Cara mendapatkan nilai  $\text{IC}_{50}$ , yaitu dilakukan terlebih dahulu uji sitotoksik dan perhitungan kematian sel menggunakan *MTT Assay*. Uji *MTT Assay* menggunakan 96 well atau sumuran. Adapun tahapan dari *MTT Assay* adalah sel dari inkubator  $\text{CO}_2$  dimasukkan pada 96 wellplate masing-masing sebanyak  $100\ \mu\text{L}$ . Peta wellplate 96 dapat dilihat pada **Lampiran 3 poin 1 halaman 77**. Kemudian diamati kondisi sel menggunakan mikroskop inverted. Kemudian diinkubasi pada inkubator selama 1-2 hari untuk menormalkan kondisi sel dan memberi waktu sel memperbanyak diri hingga konfluen 70-80%. Kemudian sel dibawa ke LAF dan media kultur dibuang serta dikeringkan dengan tisu. Kemudian ditambahkan PBS sebanyak  $100\ \mu\text{L}$  lalu dibuang dan dikeringkan dengan tisu, PBS ini berfungsi untuk mencuci sel. Kemudian dimasukkan seri konsentrasi sampel uji dalam

sumuran dengan 3 kali pengulangan dimulai dari konsentrasi terendah sampel sesuai peta perlakuan, masing-masing sampel uji ditambahkan 100  $\mu$ L. Kemudian diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> selama 24 jam untuk memberi waktu sampel uji bekerja. Diakhir waktu inkubasi, didokumentasikan kondisi sel. Kemudian dibuang media kultur dan ditambahkan PBS 100  $\mu$ L dan dilakukan pencucian dengan cara digoyang-goyang secara perlahan. Kemudian ditambahkan reagen MTT sebanyak 100  $\mu$ L dalam keadaan gelap, lalu diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> selama 2-4 jam. Kemudian ditambahkan DMSO sebanyak 100  $\mu$ L. Kemudian wellplate dishaker selama 5 menit dengan kecepatan 200 rpm. Kemudian dilakukan analisa menggunakan microplate reader pada Panjang gelombang 595 nm untuk mendapatkan nilai absorpsi sampel. Kemudian, dihitung viabilitas sel dengan rumus sebagai berikut =

$$\text{Prosentase sel hidup} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media})}{(\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media})} \times 100\%$$

Setelah didapatkan hasil dari perhitungan % viabilitas sel, kemudian dilakukan perhitungan IC<sub>50</sub> dengan cara dibuat regresi linear hubungan antara logaritma konsentrasi sebagai nilai X dengan rata-rata % viabilitas sel sebagai nilai Y. Dari perhitungan regresi linear tersebut akan didapatkan persamaan  $y = ax + b$ . IC<sub>50</sub> diperoleh dengan memasukkan nilai y adalah 50 dan akan didapatkan nilai X, nilai IC<sub>50</sub> akan didapatkan dengan menghitung antilog X.

Metode ini terdapat modifikasi yaitu dimana pada CCRC (2009), stopper MTT menggunakan SDS 10%, sedangkan pada penelitian ini menggunakan DMSO. DMSO dan SDS dapat digunakan sebagai stopper MTT dikarenakan keduanya tergolong dalam surfaktan. Serta modifikasi dari Sitorus (2013) yaitu volume sampel uji yang ditambahkan. Pada Sitorus (2013), menambahkan sampel uji sebanyak 200  $\mu$ L, sedangkan pada penelitian ini sebanyak 100  $\mu$ L.

## 2. Pengujian Apoptosis *Cell line* MCF-7 dengan Pewarna Hoechst 33342 (Modifikasi dari Chantree, *et al.* (2021)).

Proses pengujian ini diberi perlakuan sampel dengan konsentrasi yang setara dengan nilai IC<sub>50</sub> yang diperoleh. Pengujian dilakukan dengan variasi waktu inkubasi yaitu 24, 48, dan 72 jam. Tahapan-tahapan dalam proses ini

adalah penanaman sel sesuai prosedur point 7 pada tahap persiapan pada wellplate 24, sebelum dilakukan penanaman sel, masing-masing well pada wellplate diberi coverslip yang telah dipotong sesuai ukuran well. Cara pemberian coverslip tersebut adalah coverslip direndam pada alkohol 70% kemudian diambil satu persatu coverslip menggunakan pinset yang telah disterilisasi menggunakan alkohol 70%. Kemudian ditunggu hingga masing-masing well yang telah diberi coverslip mengering. Jika sudah kering, wellplate siap digunakan untuk penanaman sel.

Pemberian sampel uji dapat dilakukan setelah 1-2 hari dari penanaman sel. Pemberian sampel uji dilakukan dengan variasi waktu inkubasi. Setelah waktu inkubasi selesai wellplate dikeluarkan dari inkubator CO<sub>2</sub> untuk dilakukan fiksasi sel untuk memberhentikan aktivitas sel. Tahapan fiksasi adalah media dibuang menggunakan pipet, kemudian ditambahkan 300  $\mu$ L PFA 4% selama 10 menit, setelah itu PFA dibuang dan kemudian ditambahkan PBS dingin sebanyak 300  $\mu$ L sebanyak 2x ulangan, masing-masing selama 5 menit. Kemudian PBS dibuang dan ditambahkan dengan 300  $\mu$ L DPBS. Setelah itu, disimpan di dalam kulkas suhu 4°C hingga proses pewarnaan akan dilakukan.

Tahapan pewarnaan menggunakan pewarna Hoechst 33342 adalah wellplate dikeluarkan dari kulkas kemudian, DPBS dibuang menggunakan pipet. Setelah itu, ditambahkan larutan Hoechst 33342 sebanyak 200  $\mu$ L selama 5 menit pada ruangan yang gelap, setelah waktu selesai larutan Hoechst 33342 dibuang. Kemudian, ditambahkan DPBS 200  $\mu$ L untuk mencuci dan setelah itu DPBS dibuang. Kemudian, disiapkan object glass dan ditetaskan mounting sebanyak 1 tetes di atasnya. Diambil coverslip dari wellplate dan diletakkan di atas object glass dengan posisi terbalik. Setelah itu dilakukan pembacaan menggunakan mikroskop fluorescence pada Panjang gelombang 460-490 nm.

Tahapan penanaman sel hingga pemberian sampel uji dilakukan di dalam LAF, dikarenakan memerlukan kondisi yang steril. Sedangkan, tahapan fiksasi hingga pembacaan menggunakan mikroskop fluorescence tidak perlu dilakukan di dalam LAF. Selain hal tersebut, saat pemberian pewarna Hoechst 33342 harus dilakukan di tempat gelap, dikarenakan pewarna dapat terdegradasi saat terkena cahaya dan panas. Metode ini terdapat modifikasi, dimana berdasarkan Chantree, *et al.* (2021)

penambahan pewarna Hoechst 33342 sebanyak 10 mg/mL larutan stok yang dilarutkan pada 1:2000 pada PBS, sedangkan pada penelitian ini penambahan pewarna Hoechst sebanyak 100  $\mu$ L. Selain itu untuk pencucian pewarna Hoechst 33342, pada literatur Chantree, *et al.* (2021) menggunakan PBS dan pada penelitian ini menggunakan DPBS.

### 3. Pengujian Jumlah Sel Hidup Menggunakan Haemocytometer (Modifikasi dari CCRC (2009)).

Proses pengujian ini diberi perlakuan sampel dengan konsentrasi yang setara dengan nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh. Pengujian dilakukan dengan variasi waktu inkubasi yaitu 24, 48, dan 72 jam. Tahapan-tahapan dalam proses ini adalah penanaman sel sesuai prosedur point 7 pada tahap persiapan, setelah konfluen diberi perlakuan sampel dengan membuang media dengan cara membalik wellplate pada tisu dan sisa media dikeringkan menggunakan tisu kemudian ditambahkan sampel uji sesuai waktu inkubasi masing-masing perlakuan. Jika waktu pengujian telah selesai, lalu mengeluarkan wellplate dari dalam inkubator  $CO_2$ . Kemudian media dibuang dengan cara membalik wellplate pada tisu dan sisa media dikeringkan menggunakan tisu. Kemudian dicuci dengan PBS masing-masing well sebanyak 100  $\mu$ L dengan 2x pengulangan. Setelah itu, ditambahkan dengan tripsin-EDTA sebanyak 40  $\mu$ L selama 2 menit, selama proses tripsinasi wellplate disimpan pada inkubator  $CO_2$ . Setelah itu, ditambahkan dengan media kultur lengkap RPMI sebanyak 100  $\mu$ L. Kemudian tiap well dihomogenisasi dengan cara dipipetting dan setelah itu dipindahkan pada conical 15 mL. Kemudian ditambahkan media kultur lengkap RPMI hingga volume akhir 1 mL dan dilakukan homogenisasi. Setelah itu, kultur sel dihomogenkan dengan cara dipipetting dan diambil kultur sel sebanyak 10  $\mu$ L lalu ditambahkan dengan trypan blue sebanyak 10  $\mu$ L dan dihomogenisasi. Kemudian dipindahkan pada haemocytometer dan dilakukan perhitungan jumlah sel dengan bantuan mikroskop inverted. Metode ini terdapat modifikasi yaitu dimana pada CCRC (2009), tidak terdapat penambahan trypan blue sebagai pewarna untuk membedakan sel hidup dan sel mati, sedangkan pada penelitian ini terdapat penambahan trypan blue.

Jumlah sel dihitung dengan rumus:

$$\text{Jumlah sel per mL} = \frac{n}{4} \times P \times 10^4$$

Keterangan:

n = jumlah sel dalam keempat bidang besar

4 = jumlah bilik pada haemocytometer yang dihitung

P = faktor pengenceran terhadap indikator warna

Perhitungan jumlah sel hidup menggunakan haemocytometer dilakukan pada dua sampel, yaitu sel yang diberi perlakuan sampe uji (fukoidan) dan kontrol sel yaitu sel yang tidak diberi perlakuan sampel uji. Proses menyiapkan sampel untuk dihitung jumlah sel hidup dilakukan di dalam LAF sedangkan, untuk perhitungan sel hidup menggunakan haemocytometer dilakukan di luar LAF karena memerlukan bantuan mikroskop inverted dan tidak mengharuskan kondisi yang steril.

### 3.6 Analisis Data

#### 3.6.1 Nilai IC<sub>50</sub>

Data hasil penelitian diperoleh dari perhitungan absorbansi dengan 3 kali ulangan menggunakan *microplate reader*. Pembacaan absorpsi dilakukan pada ekstrak kasar fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium* dan ekstrak fukoidan komersial dari *F. vasiculosus* sebagai kontrol positif. Hasil data absorbansi yang dihasilkan, kemudian dihitung nilai % viabilitas sel untuk dilakukan perhitungan nilai IC<sub>50</sub> (3 kali pengulangan) menggunakan regresi linear kemudian dibandingkan dengan literatur yang relevan serta dilakukan uji *Pired T-test* menggunakan *Software Minitab17*.

#### 3.6.2 Uji Apoptosis menggunakan Pewarna Hoechst 33342

Data yang diperoleh berupa gambar hasil pembacaan menggunakan mikroskop fluorescence. Dari gambar tersebut akan dianalisis dan dibandingkan dengan literatur yang relevan.

#### 3.6.3 Jumlah Sel Hidup menggunakan Haemocytometer

Data yang diperoleh berupa % viabilitas jumlah sel hidup yang diolah dari jumlah sel hidup yang diberi perlakuan sampel uji dalam satuan jumlah sel hidup/mL dibandingkan dengan kontrol sel yaitu jumlah sel hidup tanpa perlakuan sampel uji dalam satuan jumlah sel hidup/mL yang diperoleh dari perhitungan

menggunakan haemocytometer. Setelah itu dilakukan pengujian menggunakan ANOVA dan uji lanjut Tukey menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor dengan 3 level variasi waktu inkubasi yaitu 24, 48, dan 72 jam dengan 3 kali pengulangan. Uji ANOVA dilakukan menggunakan software Minitab17. Data yang dihasilkan kemudian akan dibandingkan dengan literatur yang sesuai.



## BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Uji IC<sub>50</sub> dengan Metode MTT Assay

Uji sitotoksik dengan metode MTT Assay bertujuan untuk mengetahui nilai IC<sub>50</sub> sampel uji fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium*, yaitu konsentrasi fukoidan yang dapat menghambat pertumbuhan *cell line* MCF-7 sebanyak 50% populasi. Metode ini menggunakan MTT atau garam tetrazolium yang berwarna kuning, dimana garam tersebut akan dimetabolisme oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat pada mitokondria sel dan akan berubah menjadi kristal formazan berwarna ungu. Intensitas warna ungu yang terbentuk akan dibaca menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 595 nm. Nilai absorbansi yang dihasilkan akan berbanding lurus dengan jumlah sel yang aktif melakukan metabolisme atau sel hidup (Amir Hermansyah & Bambang Gonggo Murcitra, 2017). Hasil pegujian absorbansi Uji MTT Assay dan Viabilitas Sel MCF-7 yang Ditambahkan Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl *S. cristaefolium* ditampilkan pada **Tabel 4.1**.

#### 4.1.

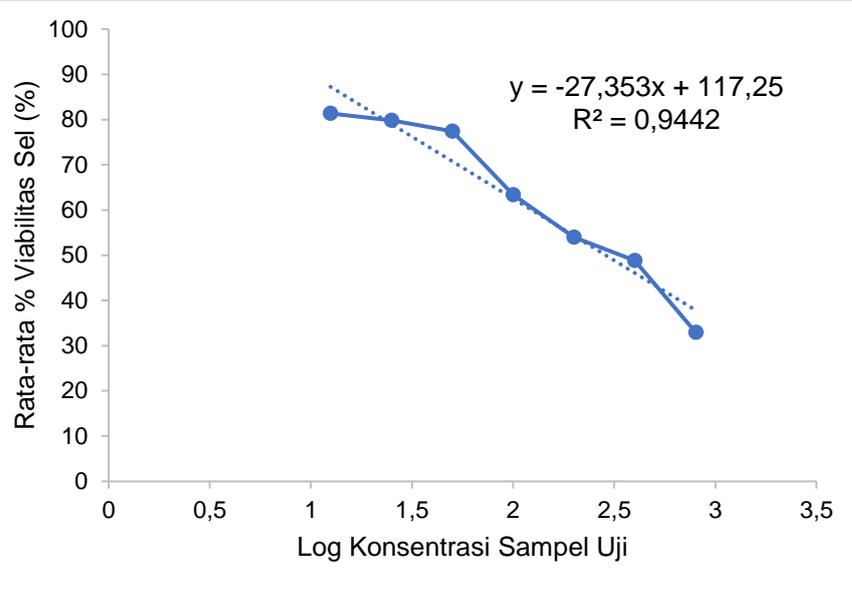
**Tabel 4.1** Data Absorbansi Uji MTT Assay dan Viabilitas Sel MCF-7 yang Ditambahkan Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl *S. cristaefolium*

Konsentrasi Sampel Uji (ppm)	Log Konsentrasi Sampel Uji	Rata-rata Absorbansi Uji MTT Assay	Rata-rata % Viabilitas (%)
12,5	1,097	1,26 ± 0,08	81,36 ± 6,17
25	1,398	1,24 ± 0,09	79,80 ± 6,83
50	1,699	1,21 ± 0,06	77,43 ± 4,41
100	2,000	1,03 ± 0,13	63,39 ± 10,10
200	2,301	0,91 ± 0,07	54,00 ± 5,33
400	2,602	0,84 ± 0,10	48,86 ± 7,47
800	2,903	0,64 ± 0,05	32,94 ± 3,79

Berdasarkan **Tabel 4.1** dapat dilihat bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak Fukoidan fraksi HCl yang ditambahkan pada sel uji, maka nilai absorbansi semakin menurun. Uraian tersebut didasarkan pada pemaparan Putram *et al.* (2017), yang menyatakan bahwa semakin banyak sel yang mati, maka akan semakin sedikit kristal formazan yang terbentuk dan sebaliknya. Hal tersebut dapat terjadi karena sel yang mati tidak lagi memiliki enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat pada mitokondria sel yang dapat mengubah garam tetrazolium menjadi kristal formazan berwarna ungu sehingga, nilai absorbansi akan menurun.

Pada pengujian ini menggunakan tujuh variasi konsentrasi sampel uji fukoidan yaitu 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; dan 800 ppm serta kontrol sel tanpa penambahan sampel uji dengan lama waktu pemberian perlakuan sampel 24 jam. Berdasarkan perlakuan yang telah dilaksanakan diperoleh nilai absorbansi sampel pada rentang 1,26-0,64 (**Tabel 4.1**). Selain pengujian pada sel uji (*cell line* MCF-7 yang diberi perlakuan fukoidan), dilakukan juga pengujian absorbansi pada kontrol sel sebagai kontrol negatif (*cell line* MFC-7 dengan media kultur lengkap RPMI tanpa penambahan ekstrak fukoidan fraksi HCl) dan didapatkan nilai absorbansi sebesar 1,499. Berdasarkan data tersebut dapat dilihat bahwa absorbansi kontrol negatif lebih tinggi dari sampel uji, sehingga dapat diartikan bahwa jumlah sel hidup lebih tinggi. Selain sel uji dan kontrol sel, dilakukan juga perhitungan nilai absorbansi kontrol media yang berisi media kultur RPMI lengkap sebagai syarat perhitungan % viabilitas sel pada uji MTT dan sebagai kontrol yang menunjukkan besarnya absorbansi ketika tidak ada sel MCF-7 dalam sampel. Nilai absorbansi kontrol media didapatkan sebesar 0,217, dimana nilai tersebut lebih rendah dari sel uji dan kontrol sel dikarenakan kontrol media hanya berisi media tanpa adanya sel MCF-7.

Berdasarkan **Tabel 4.1**, kemudian dibuat kurva regresi linear untuk menghitung nilai  $IC_{50}$  sampel ekstrak fukoidan fraksi HCl dengan sumbu x adalah log konsentrasi sampel uji dan sumbu y adalah rata-rata % viabilitas (%). Dari kurva tersebut, didapatkan persamaan regresi linear untuk menghitung nilai  $IC_{50}$  fukoidan fraksi HCl yaitu  $y = -27,353x + 117,25$ . Dari perhitungan regresi linear didapatkan nilai  $IC_{50}$  ekstrak fukoidan fraksi HCl sebesar 287,5 ppm.



Gambar 4.1 Kurva Regresi Linear Perhitungan IC<sub>50</sub>

$$y = -27,353x + 117,25$$

$$50 = -27,353x + 117,25$$

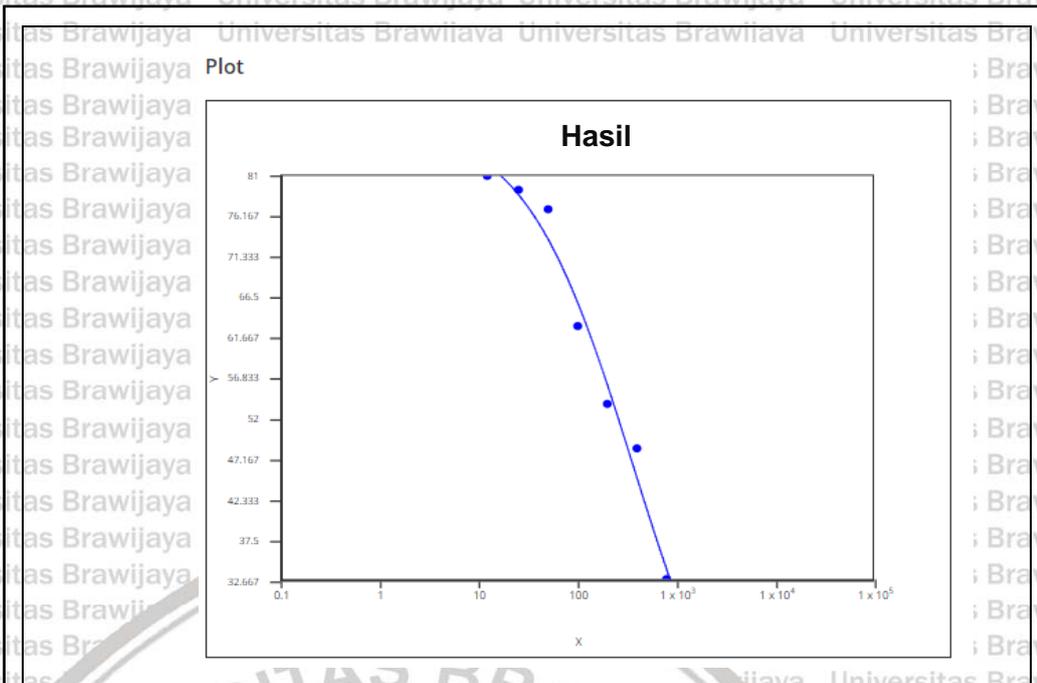
$$x = \frac{50 - 117,25}{-27,353}$$

$$x = 2,459$$

$$\text{antilog } x = 287,5$$

$$\text{IC}_{50} = 287,5 \text{ ppm}$$

Selain perhitungan nilai IC<sub>50</sub> menggunakan perhitungan manual regresi linear, dilakukan juga perhitungan nilai IC<sub>50</sub> menggunakan software AATBio dan didapatkan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 291,262 ppm. Perbedaan hasil ini terjadi karena adanya pembulatan angka pada software tersebut. Hasil perhitungan menggunakan software AATBio ditampilkan pada **Gambar 4.2**



**Perhitungan Regresi IC<sub>50</sub>**

Parameter	Nilai
IC <sub>50</sub>	367,5307
Persamaan	$Y = 4,8269 + \frac{87,5943 - 4,8269}{1 + (\frac{x}{367,5307})^{0,7896}}$
Bentuk Persaman	$Y = \text{minimum} + \frac{\text{maksimum} - \text{minimum}}{1 + (\frac{x}{IC_{50}})^{\text{koefisien}}}$

**Perhitungan Regresi IC<sub>50</sub>**

X	Y
291,262	50

**Gambar 4.2** Perhitungan Nilai IC<sub>50</sub> menggunakan Software AATBio

Cara mengetahui aktivitas biologis fukoidan terhadap *cell line* MCF-7 kanker payudara manusia dilakukan uji sitotoksik dengan metode MTT Assay. Uji sitotoksik fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium* dibandingkan dengan fukoidan standar komersial yang berasal dari *Fucus vesiculosus*. Berdasarkan **Tabel 4.2**, menunjukkan hasil bahwa fukoidan standar memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih tinggi dalam melawan *cell line* MCF-7 kanker payudara. Dimana ekstrak kasar fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium* memiliki nilai IC<sub>50</sub> 287,5 ppm dan Fukoidan standar komersial yang berasal dari *Fucus vesiculosus* memiliki nilai IC<sub>50</sub> 230 ppm. Perbedaan nilai IC<sub>50</sub> ini dikarenakan kemurnian sampel yang berbeda. Ekstrak kasar fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium*, memungkinkan masih mengandung pengotor seperti alginat yang tidak terpresipitasi dengan sempurna, laminaran, manitol, monomer selain fukosa yaitu galaktosa. Di sisi lain, fukoidan standar komersial yang berasal dari *F. vesiculosus* mengandung sulfat, protein yang rendah (0,06 ppm), monomer penyusun hanya fukosa dan tidak ada monomer yang lain. Selain hal tersebut, fukoidan komersial memiliki berat molekul yang lebih rendah, sehingga fukoidan komersial lebih murni dan memiliki bioaktivitas yang lebih tinggi yang dibuktikan dengan memiliki nilai IC<sub>50</sub> yang lebih kecil (Sinurat *et al.*, 2011; Sinurat & Kusumawati, 2017).

**Tabel 4.2** Nilai IC<sub>50</sub> Fukoidan Fraksi HCl dari *S. cristaefolium* dan Fukoidan Standar Komersial

Nama Sampel	Nilai IC <sub>50</sub> (ppm)
Ekstrak fukoidan fraksi HCl dari <i>Sargassum cristaefolium</i>	287,5 ± 0,17
Fukoidan standar komersial yang berasal dari <i>Fucus vesiculosus</i>	230 ± 0,18

Berdasarkan data nilai IC<sub>50</sub> pada **Tabel 4.2**, fukoidan standar dan fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium* ekstrak fukoidan komersial termasuk senyawa antikanker yang cukup aktif. Uraian tersebut didasarkan pada pemaparan Pérez *et al.* (2017), yang menyatakan bahwa senyawa antikanker termasuk dalam kategori sangat aktif jika memiliki nilai IC<sub>50</sub> <10 ppm, kategori aktif jika memiliki

nilai IC<sub>50</sub> 10-100 ppm, kategori cukup aktif jika memiliki nilai IC<sub>50</sub> 100-500 ppm, dan kategori tidak memiliki aktivitas sitotoksik jika memiliki nilai IC<sub>50</sub> >500 ppm.

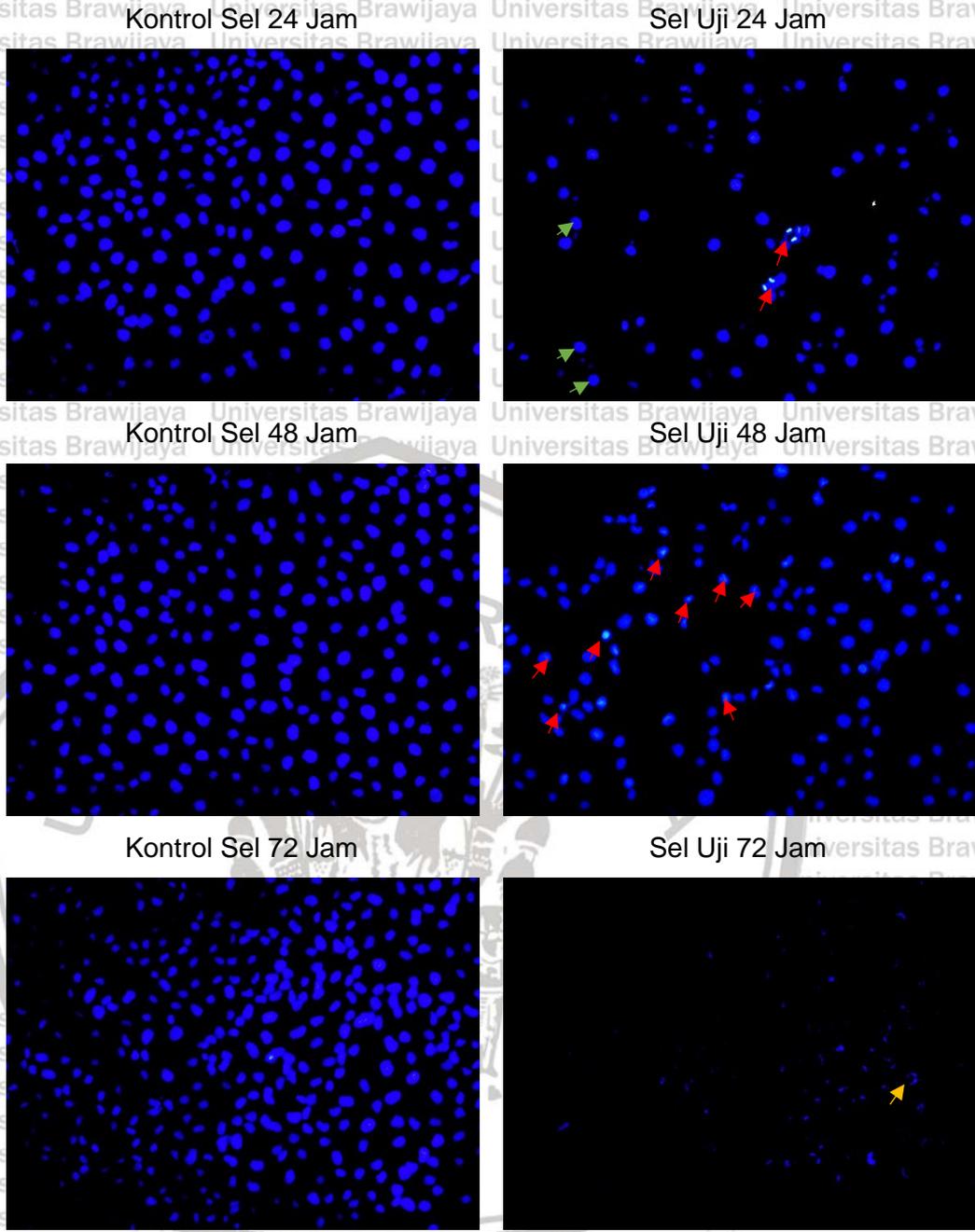
**Tabel 4.3** Hasil Uji *Pired T Test* Nilai IC<sub>50</sub> antara Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl dengan Ekstrak Fukoidan Komersial pada Tingkat Kepercayaan 95%

	Rata-rata Nilai IC <sub>50</sub> (ppm)	Nilai P
Nilai IC <sub>50</sub> Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl dari <i>S. cristaefolium</i>	287,5 ± 0,17	0,302
Nilai IC <sub>50</sub> Ekstrak Fukoidan Komersial dari <i>F. vesiculosus</i>	230 ± 0,18	
Perbedaan	57,5 ± 0,01	

Pada **Tabel 4.3** dilakukan Uji *Pired T Test* Nilai IC<sub>50</sub> antara ekstrak fukoidan fraksi HCl dengan ekstrak fukoidan komersial dengan tingkat kepercayaan 95% dan didapatkan nilai P sebesar 0,302, dimana nilai tersebut lebih besar dari 0,05. Sehingga, dapat diartikan bahwa nilai IC<sub>50</sub> antara ekstrak fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium* dengan ekstrak fukoidan komersial dari *F. vesiculosus* tidak berbeda nyata.

#### 4.2 Uji Apoptosis Sel MCF-7 menggunakan Pewarna Hoechst 33342

Tujuan uji apoptosis dengan metode Hoechst 33342 adalah untuk mengetahui sel MCF-7 yang mengalami apoptosis selama proses perlakuan sampel ekstrak Fukoidan fraksi HCl. Apoptosis sel dapat diketahui dengan menggunakan pewarna Hoechst 33342. Pewarna Hoechst 33342 merupakan pewarna DNA pada sel yang tereksitasi oleh sinar ultraviolet dan akan memancarkan fluoresensi berwarna biru dengan panjang gelombang 460 – 490 nm (Bučević & Lukinavič, 2018). Pada pengujian ini, konsentrasi sampel uji yang diberikan pada sel uji setara dengan nilai IC<sub>50</sub> yaitu 287,5 ppm dengan variasi waktu pemberian sampel uji 24, 48, dan 72 jam. Hasil dari uji apoptosis menggunakan pewarna Hoechst 33342 ditampilkan pada **Gambar 4.3**.



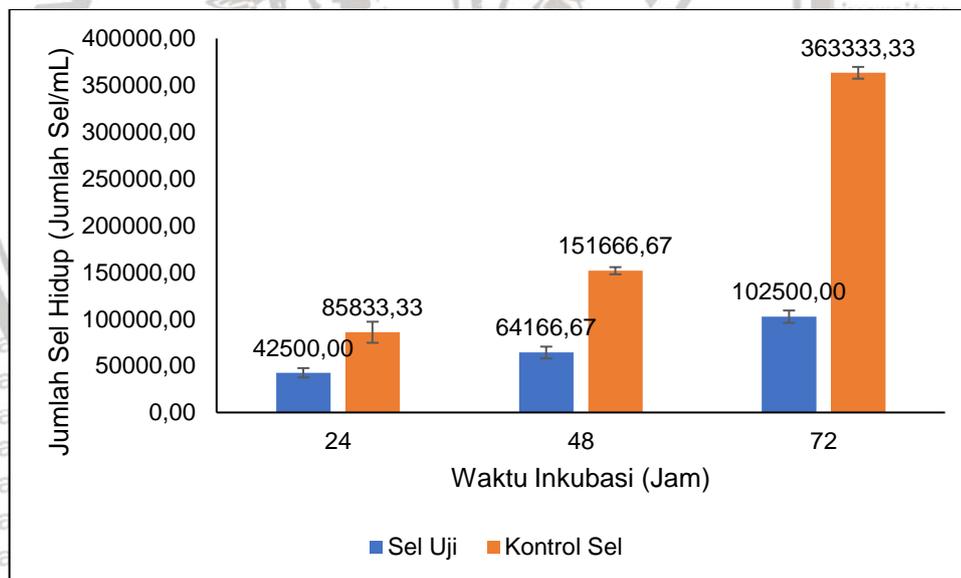
**Gambar 4.3.** Hasil Pembacaan Uji Apoptosis dengan Pewarna Hoechst 33342 pada Berbagai Variasi Waktu Pemberian Sampel Uji menggunakan Mikroskop Fluorescence pada Perbesaran 100x. (→) sel hidup atau normal; (→) sel mengalami apoptosis awal dan; (→) sel mengalami apoptosis lanjut.

**Gambar 4.3** merupakan hasil pengujian apoptosis sel MCF-7 menggunakan pewarna Hoechst 33342 menggunakan variasi waktu inkubasi (24, 48, dan 72 jam). Pada waktu inkubasi 24 jam menunjukkan hasil sel MCF-7 mulai banyak yang mengalami apoptosis, ditunjukkan pada gambar banyaknya sel yang berpendar. Namun, masih terdapat juga sel normal atau sel yang sehat. Pada waktu inkubasi 48 jam menunjukkan hasil sel yang mengalami apoptosis dengan adanya sel yang berpendar dan terjadi penurunan volume atau sel mengalami pengekerutan, dimana pengurangan volume pada sel merupakan salah satu tanda apoptosis. Pada waktu inkubasi 72 jam sel mengalami kerusakan atau fragmentasi yang diketahui dari gambar pada sel tidak berbentuk bulat lagi. Berdasarkan uraian tersebut dapat diartikan bahwa lama waktu inkubasi mempengaruhi jumlah sel yang mengalami apoptosis dan morfologi sel MCF-7, semakin lama waktu inkubasi kondisi sel MCF-7 semakin banyak yang mengalami apoptosis dan rusak. Di sisi lain, pada kontrol sel menunjukkan sel yang bulat penuh yang menunjukkan kondisi sel hidup dan normal. Penjelasan morfologi dari sel yang mengalami apoptosis didasarkan pada pemaparan Sari (2018), dimana sel yang mengalami apoptosis terjadinya fragmentasi kromatin dan kondensasi nuklear pada inti sel serta diikuti dengan berkurangnya volume sel (piknosis). Tahap awal apoptosis terjadi perpecahan kromatin, namun membrane sel masih utuh (karioheksis). Tahap akhir apoptosis terjadi penonjolan membran, modifikasi ultrastruktural organel pada sitoplasma, dan hilangnya integritas membran sehingga terjadi fragmentasi.

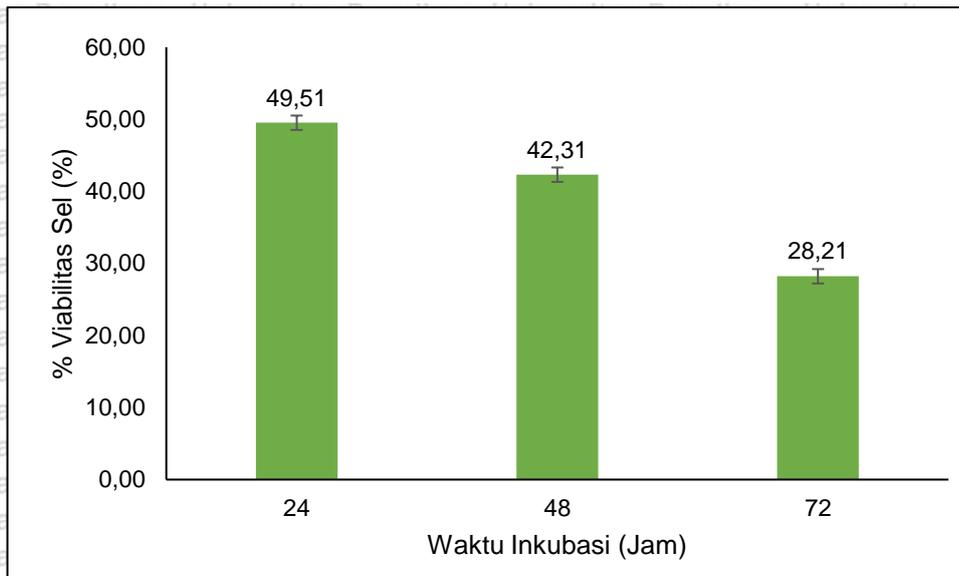
Hasil yang serupa juga dilakukan oleh penelitian Hu *et al.* (2002), yang melaksanakan penelitian terkait ekstrak *Ganoderma Lucidum* yang mampu menginduksi proses apoptosis sel MCF-7 menunjukkan hasil bahwa penambahan ekstrak *Ganoderma Lucidum* sebanyak 500 ppm mampu menginduksi apoptosis pada sel MCF-7 dengan cara yang bergantung pada waktu (12, 24, 36, 48 jam), yang ditandai dengan penyusutan inti, kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA yang signifikan. Efek yang paling signifikan diamati 36 jam setelah pengujian. Penelitian tentang uji apoptosis juga dilakukan oleh Chaouki *et al.* (2009), yaitu memanfaatkan Sitral yang merupakan komponen utama dalam minyak kulit buah jeruk untuk menginduksi apoptosis sel MCF-7 dengan 2 variasi konsentrasi ekstrak yaitu  $10 \times 10^{-5}$  dan  $10 \times 10^{-5}$  M menunjukkan hasil peningkatan apoptosis masing-masing sebesar 2,22 dan 4,16 kali dibandingkan dengan kontrol, sehingga sitral termasuk senyawa yang mampu menginduksi apoptosis pada sel MCF-7.

### 4.3 Perhitungan Jumlah Sel Hidup menggunakan Haemocytometer

Haemocytometer merupakan instrumen yang digunakan untuk menghitung jumlah sel secara manual. Menggunakan haemocytometer dapat diketahui jumlah sel MCF-7 hidup yang telah diberi perlakuan ekstrak fukoidan fraksi HCl yang setara dengan nilai  $IC_{50}$  pada uji MTT Assay yaitu 287,5 ppm dengan variasi waktu pengujian 24, 48, dan 72 jam. Tujuan pengujian ini untuk mengetahui apakah variasi waktu mempengaruhi viabilitas sel MCF-7. Cara mengetahui viabilitas sel MCF-7 perlu dibandingkan dengan kontrol sel, yaitu sel yang ditumbuhkan tanpa sampel uji. Berdasarkan pengujian yang dilakukan, didapatkan hasil yang ditampilkan pada **Gambar 4.4**. Berdasarkan gambar tersebut dapat diketahui bahwa rata-rata jumlah sel hidup pada sel uji dengan variasi waktu inkubasi 24, 48, 72 jam secara berturut-turut adalah 42.500; 64.166,67; dan 102.500 sel/mL serta rata-rata jumlah sel hidup pada kontrol sel dengan variasi waktu inkubasi 24, 48, 72 jam secara berturut-turut adalah 85.833,33; 151.666,67; dan 363.333,33 sel/mL. Berdasarkan data tersebut dapat diketahui jika semakin lama waktu inkubasi, jumlah sel hidup semakin meningkat.



**Gambar 4.4** Grafik Pengaruh Waktu Inkubasi antara Sel Uji dan Kontrol Sel terhadap Jumlah Sel Hidup



**Gambar 4.5** Grafik Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Persen Viabilitas Sel

Berdasarkan **Gambar 4.4** dapat diketahui bahwa semakin lama waktu inkubasi, jumlah sel semakin meningkat antara sel uji MCF-7 dan kontrol sel. Sedangkan, nilai % viabilitas sel mengalami penurunan pada waktu inkubasi 24, 48, dan 72 jam secara berturut-turut adalah 49,5%; 42,3%; dan 28,2%. Grafik persen viabilitas sel dapat dilihat pada **Gambar 4.5**. Penurunan persen viabilitas ini dapat terjadi karena pertumbuhan sel uji yang tidak sebanding dengan kontrol sel, dimana pertumbuhan kontrol sel sangat signifikan seiring semakin lamanya waktu inkubasi. Pertumbuhan sel uji yang lambat ini dapat terjadi karena pada sel uji terdapat penambahan ekstrak fukoidan fraksi HCl, sehingga dapat artikan bahwa ekstrak fukoidan fraksi HCl mempengaruhi pertumbuhan sel MCF-7. Hasil tersebut sesuai dengan pengujian apoptosis menggunakan pewarna Hoechst 33342, dimana semakin lama waktu inkubasi, sel uji akan mengalami kerusakan.

Uraian tersebut sesuai dengan penelitian-penelitian yang ada sebelumnya, dimana berdasarkan Rahardhian & Utami (2016), yang melakukan penelitian pengaruh ekstrak binahong terhadap pertumbuhan sel HeLa dengan variasi waktu inkubasi 24-72 jam menunjukkan hasil bahwa semakin lama waktu inkubasi jumlah sel semakin meningkat, namun pertumbuhan sel uji tidak signifikan kontrol.

Selain itu penelitian yang dilakukan Dona *et al.* (2016), mengenai Uji sitotoksitas dan antiproliferatif ekstrak etanol daun leunca (*Solanum nigrum, L.*) terhadap sel raji menunjukkan lama waktu inkubasi mempengaruhi jumlah sel hidup. Antara kontrol sel dan sel uji mengalami peningkatan jumlah sel hidup, namun jumlah sel

hidup lebih rendah pada sel uji. Begitupun penelitian yang dilakukan Pertiwi *et al.* (2020), yang melakukan penelitian mengenai pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata lin*) terhadap viabilitas *cell line* kanker payudara T47D secara *in-vitro* menunjukkan hasil yang serupa terjadinya penurunan viabilitas sel semakin lama waktu inkubasi. Hal tersebut dapat terjadi karena ekstrak uji mampu menghambat proliferasi atau mempunyai sifat antiproliferasi melalui mekanisme penundaan waktu penggandaan, sehingga pertumbuhan sel uji tidak secepat kontrol sel yang tidak diberi sampel uji.

Berdasarkan uraian tersebut, kemudian dilakukan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk mengetahui lebih lanjut apakah variasi waktu inkubasi memberikan pengaruh yang signifikan pada jumlah sel hidup MCF-7. Hasil Uji ANOVA ditampilkan pada **Tabel 4.4**.

**Tabel 4.4** Hasil Uji Lanjut Tukey dengan Tingkat Kepercayaan 95%

Perlakuan Waktu Inkubasi (Hari)	Rata-rata Jumlah Sel Hidup (Jumlah Sel/mL)	Notasi
1	102.500 ± 5.000	a
2	64.167 ± 6.291,53	b
3	42.500 ± 6.614,38	c

Berdasarkan uji ANOVA pada **Lampiran 7, halaman 84** dapat dilihat bahwa waktu inkubasi memberikan pengaruh yang signifikan yang ditandai dengan nilai P kurang dari 0,05. Berdasarkan hasil tersebut, dilakukan uji lanjut Tukey untuk mengetahui apakah masing-masing variasi perlakuan memiliki pengaruh yang signifikan. Berdasarkan uji lanjut Tukey **Tabel 4.4** menghasilkan notasi huruf yang berbeda pada ketiga variasi perlakuan. Berdasarkan uraian tersebut, dapat diartikan bahwa masing-masing variasi perlakuan memiliki pengaruh yang signifikan pada respon atau jumlah sel hidup.

## BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

1. Hasil uji sitotoksik fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium* pada *cell line* MCF-7 menghasilkan nilai  $IC_{50}$  sebesar 287,5 ppm. Angka tersebut membuat fukoidan fraksi HCl termasuk dalam senyawa antikanker kategori cukup aktif.
2. Ekstrak fukoidan fraksi HCl kemudian dilakukan uji kemampuan menginduksi apoptosis menggunakan metode pewaranaan Hoechst 33342 dan didapatkan hasil pada waktu inkubasi 24 dan 48 jam menunjukkan hasil mulai terdapat sel yang mengalami apoptosis yang ditandai dengan adanya pendaran warna biru cerah dan sel mengalami kondensasi kromatin serta pengecilan volume sel. Pada waktu inkubasi 72 jam, sel mengalami kerusakan yang ditandai dengan sel yang terfragmentasi.
3. Pengujian jumlah sel hidup menggunakan haemocytometer, menunjukkan hasil jumlah sel hidup antara kontrol sel dan sel uji mengalami peningkatan seiring waktu inkubasi, namun jumlah sel hidup pada sel uji lebih rendah dari kontrol sel. Perhitungan persen viabilitas sel pada waktu inkubasi 24, 48, dan 72 jam secara berturut-turut adalah 49,5%; 42,3%; dan 28,2%. Hasil tersebut menunjukkan penurunan viabilitas sel seiring lamanya waktu inkubasi. Pada uji ini uji lanjut Tukey menunjukkan variasi waktu inkubasi berpengaruh nyata terhadap jumlah sel hidup MCF-7.

### 5.2 Saran

Dari hasil penelitian ini, terdapat beberapa saran apabila hendak dilakukan penelitian serupa agar mampu menghasilkan penelitian yang lebih baik lagi.

Beberapa saran dari penelitian ini:

1. Perlu dilakukan perhitungan konsentrasi fukoidan pada ekstrak uji (Ekstrak fukoidan fraksi HCl dari *S. cristaefolium*) sehingga, dapat diketahui kemurnian dari fukoidan.
2. Dilakukan pengujian secara in-vivo untuk mengetahui lebih lanjut potensi Fukoidan sebagai senyawa antikanker.
3. Jarak waktu pemberian reagen DMSO sebagai stopper MTT diusahakan sesingkat mungkin karena dapat mempengaruhi hasil pembacaan absorbansi menggunakan microplate reader.

4. Dalam perhitungan jumlah sel hidup menggunakan haemocytometer, sebelum dilakukan perhitungan, kultur sel harus dihomogenisasi agar sebaran kultur merata dan didapatkan jumlah sel yang akurat dan seragam.

5. Perlu dilakukan pengujian apoptosis menggunakan pewarna Hoechst 33342 yang dikombinasikan dengan pewarna lain seperti fluorescein isothiocyanate atau Texas red dengan tujuan untuk mendeteksi kejadian seluler lain yang merupakan karakteristik dari apoptosis.



## DAFTAR PUSTAKA

- Ahlina, F. N., Nugraheni, N., Salsabila, I. A., Haryanti, S., Da'i, M., & Meiyanto, E. (2020). Revealing the reversal effect of galangal (*Alpinia galanga* L.) extract against oxidative stress in metastatic breast cancer cells and normal fibroblast cells intended as a Co-chemotherapeutic and anti-ageing agent. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 21(1), 107–117. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.1.107>
- Al-Muqbal, M. H. S., Al-Alawi, A., Waly, M. I., & Shafiur Rahman, M. (2019). Anticancer Properties of Fucoidans Extracted from Brown Seaweed (*Sargassum ilicifolium*) In a Rat Model of Gastric Cancer. *Canadian Journal of Clinical Nutrition*, 7(2), 43–61. <https://doi.org/10.14206/canad.j.clin.nutr.2019.02.04>
- Ale, M. T., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2011). Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Marine Drugs*, 9(10), 2106–2130. <https://doi.org/10.3390/md9102106>
- Amada, K. O. J. I. Y. (2009). *Fucoidan Induces Apoptosis through Activation of Caspase-8 on Human Breast Cancer MCF-7 Cells*. 8677–8682. <https://doi.org/10.1021/jf9010406>
- Amalia, P. K. (2016). Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus (*Thyphonium flagelliforme* L), Kemangi (*Ocimum sanctum* L.), dan Pepaya (*Carica papaya* L.) Terhadap Sel MCF-7. *Skripsi*, 15. [http://eprints.ums.ac.id/48462/1/NASKAH\\_PUBLIKASI.pdf](http://eprints.ums.ac.id/48462/1/NASKAH_PUBLIKASI.pdf)
- Hermansyah, A. & Murcitro, B. G. (2017). Uji MICROTETRAZOLIUM (MTT) EKSTRAK METANOL DAUN *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA MCF. *Alotrop*, 1(1), 27–32.
- Atashrazm, F., Lowenthal, R. M., Woods, G. M., Holloway, A. F., & Dickinson, J. L. (2015). Fucoidan and cancer: A multifunctional molecule with anti-tumor

potential. *Marine Drugs*, 13(4), 2327–2346.  
<https://doi.org/10.3390/md13042327>

Bower, J. J., Vance, L. D., Psioda, M., Smith-Roe, S. L., Simpson, D. A., Ibrahim, J. G., Hoadley, K. A., Perou, C. M., & Kaufmann, W. K. (2017). Patterns of cell cycle checkpoint deregulation associated with intrinsic molecular subtypes of human breast cancer cells. *Npj Breast Cancer*, 3(1), 1–9.  
<https://doi.org/10.1038/s41523-017-0009-7>

Bucevič, J., & Lukinavič, G. (2018). *The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and Beyond*. <https://doi.org/10.3390/chemosensors6020018>

Cadena-Herrera, D., Esparza-De Lara, J. E., Ramirez-Ibañez, N. D., López-Morales, C. A., Pérez, N. O., Flores-Ortiz, L. F., & Medina-Rivero, E. (2015). Validation of three viable-cell counting methods: Manual, semi-automated, and automated. *Biotechnology Reports*, 7, 9–16.  
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.04.004>

CCRC. (2009). *Protokol Uji In-vitro*. [https://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page\\_id=240](https://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page_id=240)

CCRC, U. (2014). *CCRC UGM*. [https://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page\\_id=240](https://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page_id=240)

Chandra, R. G., & Sanjib, R. (2017). Antiproliferative and apoptosis inducing activities of leaf organic solvent extract fractions of *clerodendrum viscosum* vent. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 8(3).  
<https://doi.org/10.22376/ijpbs.2017.8.3.p58-66>

Chaouki, W., Leger, D. Y., Liagre, B., Beneytout, J. L., & Hmamouchi, M. (2009). Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 23(5), 549–556.  
<https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2009.00738.x>

Comşa, Ş., Cîmpean, A. M., & Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 Years of experience in research. *Anticancer Research*, 35(6), 3147–3154.

Dharmayanti, I. (2003). KAJIAN BIOLOGI MOLEKULER : GEN SUPPRESSOR TUMOR ( p53 ) SEBAGAI TARGET GEN DALAM PENGOBATAN KANKER. *Wartazoa*, 13(3), 99–107. <http://pasca-farmasi.uad.ac.id/wp->

content/uploads/Kanker\_karsinogenesis\_molekuler-kanker\_artikel.pdf

Do Amaral, J. B., Rezende-Teixeira, P., Freitas, V. M., & MacHado-Santelli, G. M. (2011). MCF-7 cells as a three-dimensional model for the study of human breast cancer. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 17(11), 1097–1107. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2011.0260>

Dona, R., Sulistyani, N., & Nurani, L. H. (2016). Uji sitotoksitas dan antiproliferatif ekstrak etanol daun leunca (*Solanum Nigrum,L*) terhadap sel raji. *Pharmaciana*, 6(2), 181–190. <https://doi.org/10.12928/pharmaciana.v6i2.3506>

Fitriatuzzakiyyah, N., Sinuraya, R. K., & Puspitasari, I. M. (2017). *Cancer Therapy with Radiation : The Basic Concept of Radiotherapy and Its Development in Indonesia Terapi Kanker dengan Radiasi : Konsep Dasar Radioterapi dan Perkembangannya di Indonesia Cancer Therapy with Radiation : The Basic Concept of Radiotherapy a. December*. <https://doi.org/10.15416/ijcp.2017.6.4.311>

Gnant, M., Mlineritsch, B., Schippinger, W., Luschin-Ebengreuth, G., Pörtlberger, S., Menzel, C., Jakesz, R., Seifert, M., Hubalek, M., Bjelic-Radisic, V., Samonigg, H., Tausch, C., Eidtmann, H., Steger, G., Kwasny, W., Dubsy, P., Fridrik, M., Fitzal, F., Stierer, M., ... Greil, R. (2009). Endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal breast cancer. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 64(6), 391–393. <https://doi.org/10.1097/01.ogx.0000349780.90268.9d>

Hoadley, K. A., Yau, C., Hinoue, T., Stuart, J. M., Benz, C. C., Laird, P. W., Hoadley, K. A., Yau, C., Hinoue, T., Wolf, D. M., & Lazar, A. J. (2018). *Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Article Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10 , 000 Tumors from 33 Types of Cancer*. 291–304. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.022>

Hu, H., Ahn, N. S., Yang, X., Lee, Y. S., & Kang, K. S. (2002). Ganoderma lucidum extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. *International Journal of Cancer*, 102(3), 250–253. <https://doi.org/10.1002/ijc.10707>

Huang, Y., Ray, S., Reed, J. C., Ibrado, A. M., Tang, C., Nawabi, A., & Bhalla, K. (1997). Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21Bax ratios and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 42(1), 73–81.

<https://doi.org/10.1023/A:1005777219997>

Isnansetyo, A., Nor, F., Lutfia, L., Nursid, M., Susidarti, R. A., & Isnansetyo, A. (2017). Cytotoxicity of Fucoidan from Three Tropical Brown Algae Against Breast and Colon Cancer Cell Lines. 9(1), 14–20.

Janodien, F., & Fatima. (2016). Proteome signature of breast cancer cells treated with fucoidan. <http://hdl.handle.net/11394/5315>

Kadi. (2005). BEBERAPA CATATAN KEHADIRAN MARGA SARGASSUM. XXX(4), 19–29.

Kemkes RI. (2019). *Pasien Kanker Payudara*.

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2019). Panduan Penatalaksanaan Kanker Payudara (Breast Cancer Treatment Guideline). *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 4(4), 1–50. <http://kanker.kemkes.go.id/guidelines/PPKPayudara.pdf>

Kurniasari, F. N. Ieny B. H. A. D. (2017). *Buku Ajar Gizi dan Kanker* (UB Press). UB Press.

Laeliocattleya, R. A., Yunianta, Suloi, A. F., Gayatri, P. P., Putri, N. A., & Anggraeni, Y. C. (2020). Fucoidan Content from Brown Seaweed (*Sargassum filipendula*) and Its Potential As Radical Scavenger. *Journal of Physics: Conference Series*, 1430(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1430/1/012023>

Langdon, S. P. (2003). Cancer Cell Culture. *Cancer Cell Culture*, 731, 237–245. <https://doi.org/10.1385/1592594069>

Lee, A. V., Oesterreich, S., & Davidson, N. E. (2015). MCF-7 Cells - Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(7), 5–9. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv073>

Li, B., Lu, F., Wei, X., & Zhao, R. (2008). Fucoidan: Structure and bioactivity. *Molecules*, *13*(8), 1671–1695. <https://doi.org/10.3390/molecules13081671>

Liu, J., Chen, Q., Feng, L., & Liu, Z. (2018). Nano Today Nanomedicine for tumor microenvironment modulation and cancer treatment enhancement. *Nano Today*, *21*, 55–73. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2018.06.008>

Lu, J., Shi, K. K., Chen, S., Wang, J., Hassouna, A., White, L. N., Merien, F., Xie, M., Kong, Q., Li, J., Ying, T., White, W. L., & Nie, S. (2018). Fucoidan extracted from the New Zealand *Undaria pinnatifida*—physicochemical comparison against five other fucoidans: Unique low molecular weight fraction bioactivity in breast cancer cell lines. *Marine Drugs*, *16*(12). <https://doi.org/10.3390/md16120461>

Lumbir, P., & Banyumas, K. (2016). *PENGARUH PENGOBATAN ALTERNATIF SEBAGAI FAKTOR PENYEBAB KETERLAMBATAN PENANGANAN MEDIS PENDERITA KANKER PAYUDARA DI PUSKESMAS LUMBIR KABUPATEN BANYUMAS*. *14*(3), 1–7.

Narayani, S. S., Saravanan, S., Ravindran, J., Ramasamy, M. S., & Chitra, J. (2019). In vitro anticancer activity of fucoidan extracted from *Sargassum cinereum* against Caco-2 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, *138*, 618–628. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.127>

Nunes, A. S., Costa, E. C., Barros, A. S., de Melo-Diogo, D., & Correia, I. J. (2019). Establishment of 2D Cell Cultures Derived From 3D MCF-7 Spheroids Displaying a Doxorubicin Resistant Profile. *Biotechnology Journal*, *14*(4), 1–16. <https://doi.org/10.1002/biot.201800268>

Or, A., Ja, A., & Oa, O. (2016). Review on *Phaleria macrocarpa* Pharmacological and Phytochemical Properties. *Drug Designing: Open Access*, *05*(03). <https://doi.org/10.4172/2169-0138.1000134>

Pakidi, C. S., & Suwono, H. suryanto. (2016). Potensi dan Pemanfaatan Bahan Aktif Alga Cokelat *Sargassum Sp. Octopus*, *5*(2), 488–498.

Pérez, A., Santamaria, E. K., Operario, D., Tarkang, E. E., Zotor, F. B., Cardoso,

S. R. de S. N., Autor, S. E. U., De, I., Dos, A., Vendas, O. D. E., Empresas, D. A. S., Atividades, P. O., Artigo, N., Gest, G. N. R. M. D. E., Para, D. E. F., Miranda, S. F. da R., Ferreira, F. A. A., Oliver, J., Dario, M., ... Volk, J. E. (2017). No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における 健康関連指標に関する共分散構造分析Title. In *BMC Public Health* (Vol. 5, Issue 1). <https://ejournal.poltektegal.ac.id/index.php/siklus/article/view/298%0Ahttp://repositorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.jana.2015.10.005%0Ahttp://www.biomedcentral.com/1471-2458/12/58%0Ahttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&P>

Pertiwi, W., Arisanty, D., & Linosefa, L. (2020). Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* lin) Terhadap Viabilitas Cell Line Kanker Payudara T47D Secara In Vitro. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 9(1S), 165–170. <https://doi.org/10.25077/jka.v9i1s.1173>

Perumalsamy, H., Sankarapandian, K., Kandaswamy, N., Balusamy, S. R., Periyathambi, D., & Raveendiran, N. (2017). Cellular effect of styrene substituted biscoumarin caused cellular apoptosis and cell cycle arrest in human breast cancer cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 92(June), 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.09.019>

Piccinini, F., Tesei, A., Arienti, C., & Bevilacqua, A. (2017). Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures: Expected Reliability of the Trypan Blue Assay. *Biological Procedures Online*, 19(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12575-017-0056-3>

Ponce, N. M. A., Pujol, C. A., Damonte, E. B., Flores, M. L., & Stortz, C. A. (2003). Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: Extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydrate Research*, 338(2), 153–165. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00403-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00403-2)

Pramesti, R., Setyati, W. A., Zainuddin, M., & Puspita, M. (2017). Bioecology of *Sargassum* sp. and its Extract Bioactivity as Anti-MDR Bacteria. *ILMU KELAUTAN: Indonesian Journal of Marine Sciences*, 22(4), 185. <https://doi.org/10.14710/ik.ijms.22.4.185-192>

Pratama, F. E., & Nuwarda, R. F. (2018). Review: Senyawa Aktif Antikanker Dari

- Bahan Alam Dan Aktivasnya. *Farmaka*, 16(1), 1–15.
- Putram, N. M., Setyaningsih, I., & Tarman, K. (2017). Anticancer Activity from Active Fraction of Sea Cucumber. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 20(1), 53. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v20i1.16399>
- Rahardhian, M. R. R., & Utami, D. (2016). Uji Sitotoksik Dan Antiproliferasi Ekstrak Eter Daun Binahong (*Androdera Cordifolia* (Tenore ) Steen .) Terhadap Sel Hela. *Media Farmasi Indonesia*, 13(1), 1284–1292.
- Saepudin, E., Qosthalani, F. A., & Sinurat, E. (2018). Fucoidan cytotoxicity against human breast cancer T47D cell line increases with higher level of sulfate ester group. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 299(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/299/1/012025>
- Salsabila, D. N., Purnama, A., Febriana, Y., Anshory, H., & Nugraha, A. T. (2018). Eurycinoid: Potensi Rumput Gong (*Eurycalon Cinereum*) Khas Bangka Belitung Sebagai Kandidat Senyawa Antikanker Payudara Berbasis Bahan Alam. *Khazanah: Jurnal Mahasiswa*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.20885/khazanah.vol10.iss1.art2>
- Saraswati, Giriwono, P. E., Iskandriati, D., Tan, C. P., & Andarwulan, N. (2020). In-vitro anti-inflammatory activity, free radical (DPPH) scavenging, and ferric reducing ability (FRAP) of *Sargassum cristaefolium* lipid-soluble fraction and putative identification of bioactive compounds using UHPLC-ESI-ORBITRAP-MS/MS. *Food Research International*, 137(September), 109702. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109702>
- Sari, L. M. (2018). Apoptosis: Mekanisme Molekuler Kematian Sel. *Cakradonya Dental Journal*, 10(2), 65–70. <https://doi.org/10.24815/cdj.v10i2.11701>
- Satyarsa, A. B. S. (2019). Potential of Fucoidan From Brown Seaweeds (*Sargassum* sp.) as Innovation Therapy on Breast Cancer. *Journal of Medicine & Health*, 2(3), 909–919. <https://doi.org/10.28932/jmh.v2i3.1235>
- Senthilkumar, K., Manivasagan, P., Venkatesan, J., & Kim, S. K. (2013). Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*,

60, 366–374. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.030>

Sharma, H. P., Jain, P., Amit, P., & Sinha, A. (2014). *Apoptosis (programmed cell death) -a review. February 2015.*

Singh, A., E, C. D., & Varghese, V. I. (2014). *Apoptosis - A Review APOPTOSIS - A REVIEW. July 2010.*

Sinurat, E., & Kusumawati, R. (2017). Optimasi Metode Ekstraksi Fukoidan dari Rumpun Laut Cokelat Sargassum binderi Sonder. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. JPB Kelautan Dan Perikanan*, 12(2), 125–134.

Sinurat, E., Peranginangin, R., & Saefudin, E. (2011). Ekstraksi dan Uji Aktivitas Fukoidan dari Rumpun Laut Coklat (*Sargassum crassifolium*) sebagai Antikoagulan. In *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan* (Vol. 6, Issue 2). <https://doi.org/10.15578/jpbkp.v6i2.405>

Siregarr, F., & Hadijono, B. S. (2000). Uji Sitotoksitas Dengan Esei Mtt. *Jurnal Kedokteran Gigi*, 7, 28–32.

Sitorus, S. (2013). *Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol Angiopteris angustifolia C. Pres1 terhadap Kultur Sel Kanker Payudara (MCF-7 Cell Line) secara In Vitro.* Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta.

Van Weelden, G., Bobi, M., Okla, K., van Weelden, W. J., Romano, A., & Pijnenborg, J. M. A. (2019). Fucoidan structure and activity in relation to anti-cancer mechanisms. *Marine Drugs*, 17(1). <https://doi.org/10.3390/md17010032>

Windrasari, W., Wahyuni, F. S., & Khambri, D. (2019). Evaluasi Terapi Adjuvant Hormonal Dan Hubungannya Terhadap Outcome Klinis Pasien Kanker Payudara Stadium Dini Di Kota Padang. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 5(3), 176. <https://doi.org/10.25077/jsfk.5.3.176-184.2018>

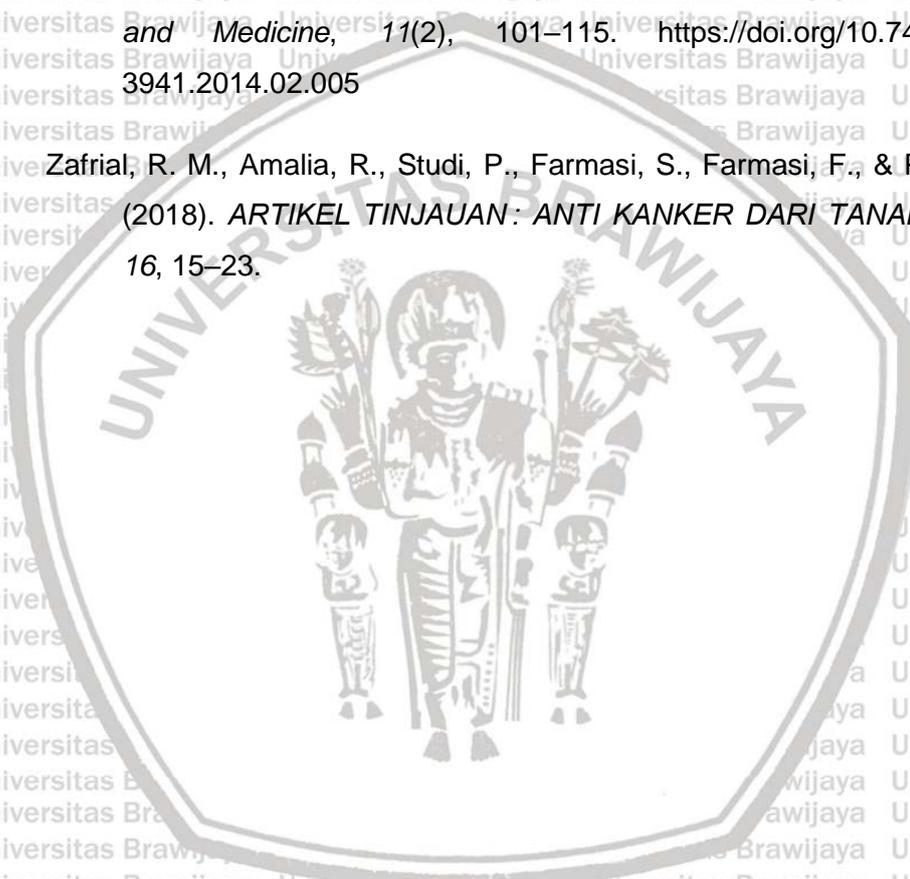
Wulandari, R. (2012). *PENDERITA KANKER PAYUDARA STADIUM LOKAL-LANJUT Studi Angka Harapan Hidup Dua Tahun JURNAL MEDIA MEDIKA MUDA UNIVERSITAS DIPONEGORO TAHUN 2012 PENDERITA KANKER PAYUDARA STADIUM LOKAL-LANJUT Studi Terhadap Angka Harapan*

Hidup Dua Tahun.

Yang, C., Chung, D., Shin, I. S., Lee, H. Y., Kim, J. C., Lee, Y. J., & You, S. G. (2008). Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(5), 433–437. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.08.006>

Youlden, D. R., Cramb, S. M., Yip, C. H., & Baade, P. D. (2014). Incidence and mortality of female breast cancer in the Asia-Pacific region. *Cancer Biology and Medicine*, 11(2), 101–115. <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2014.02.005>

Zafrial, R. M., Amalia, R., Studi, P., Farmasi, S., Farmasi, F., & Padadjaran, U. (2018). ARTIKEL TINJAUAN: ANTI KANKER DARI TANAMAN HERBAL. 16, 15–23.

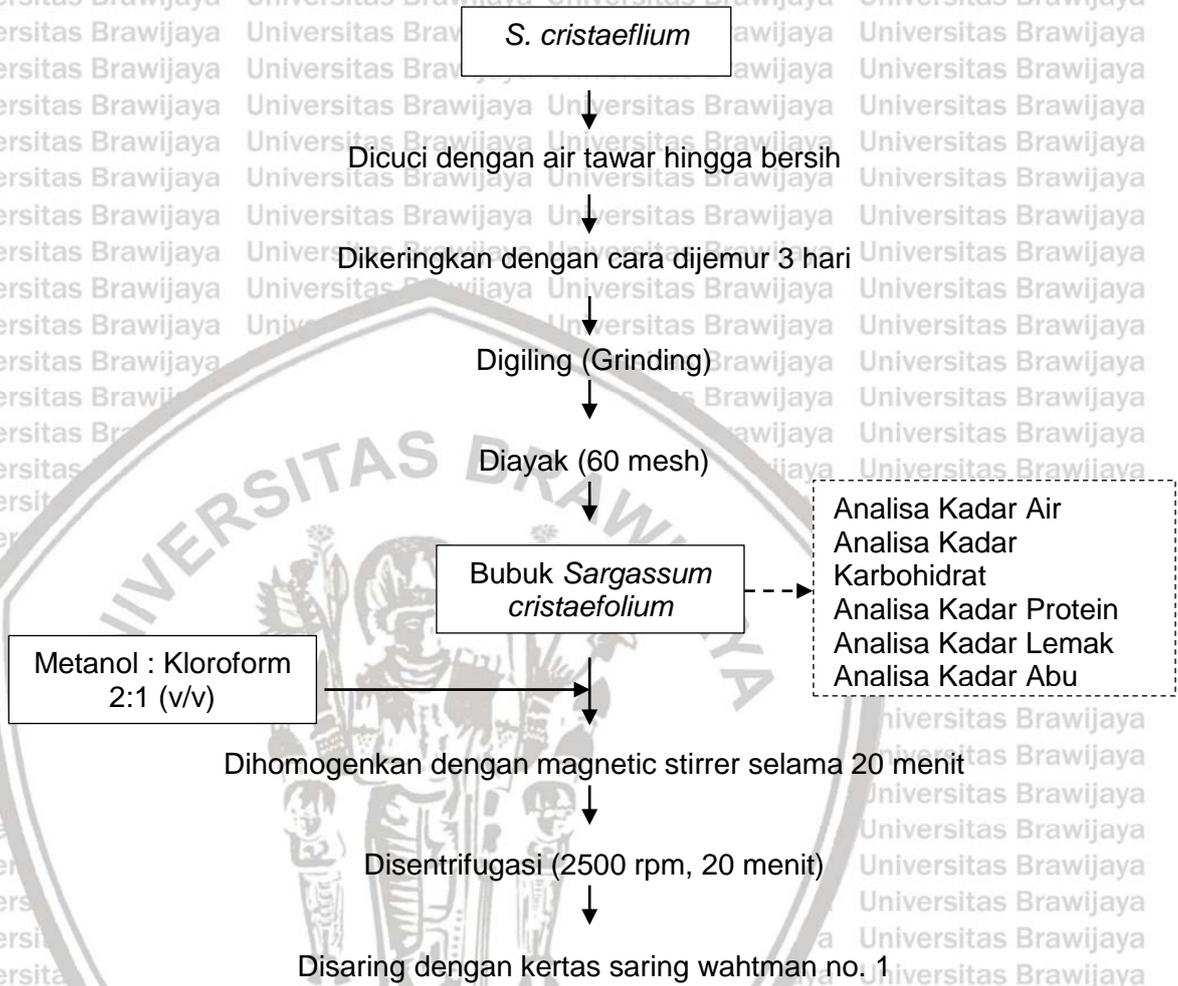


LAMPIRAN

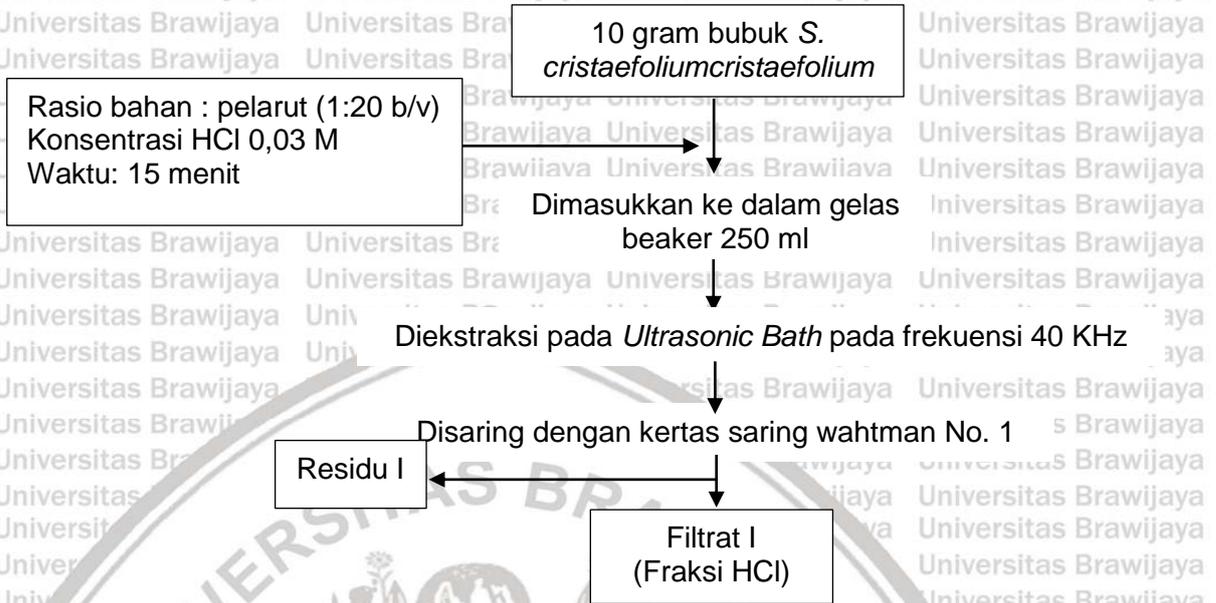
Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian

1. Diagram Alir Ekstraksi Fukoidan

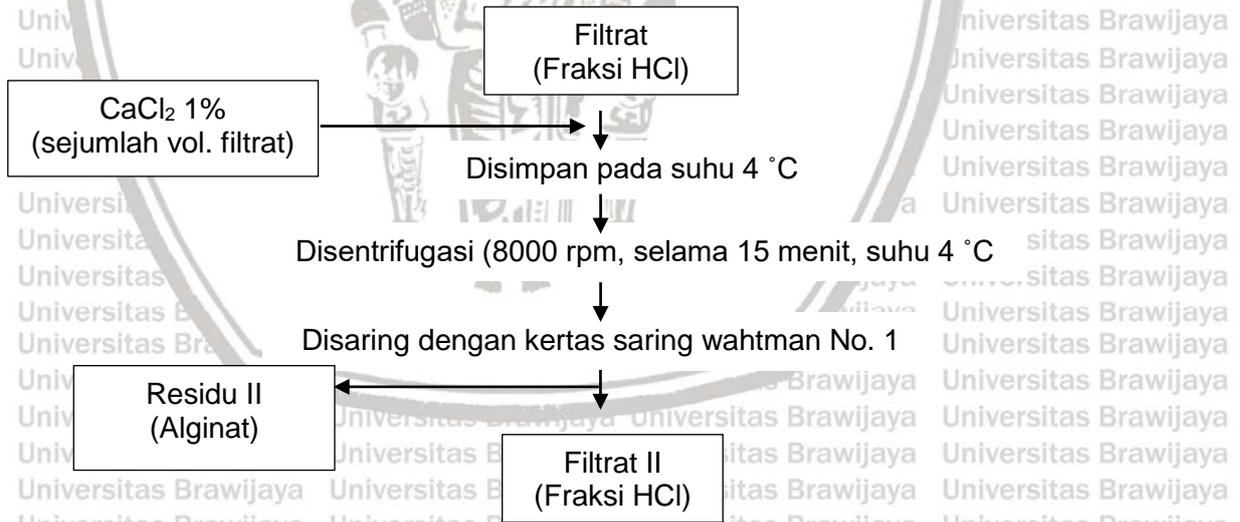
• Diagram Alir Persiapan Sampel dan *Pre-treatment*



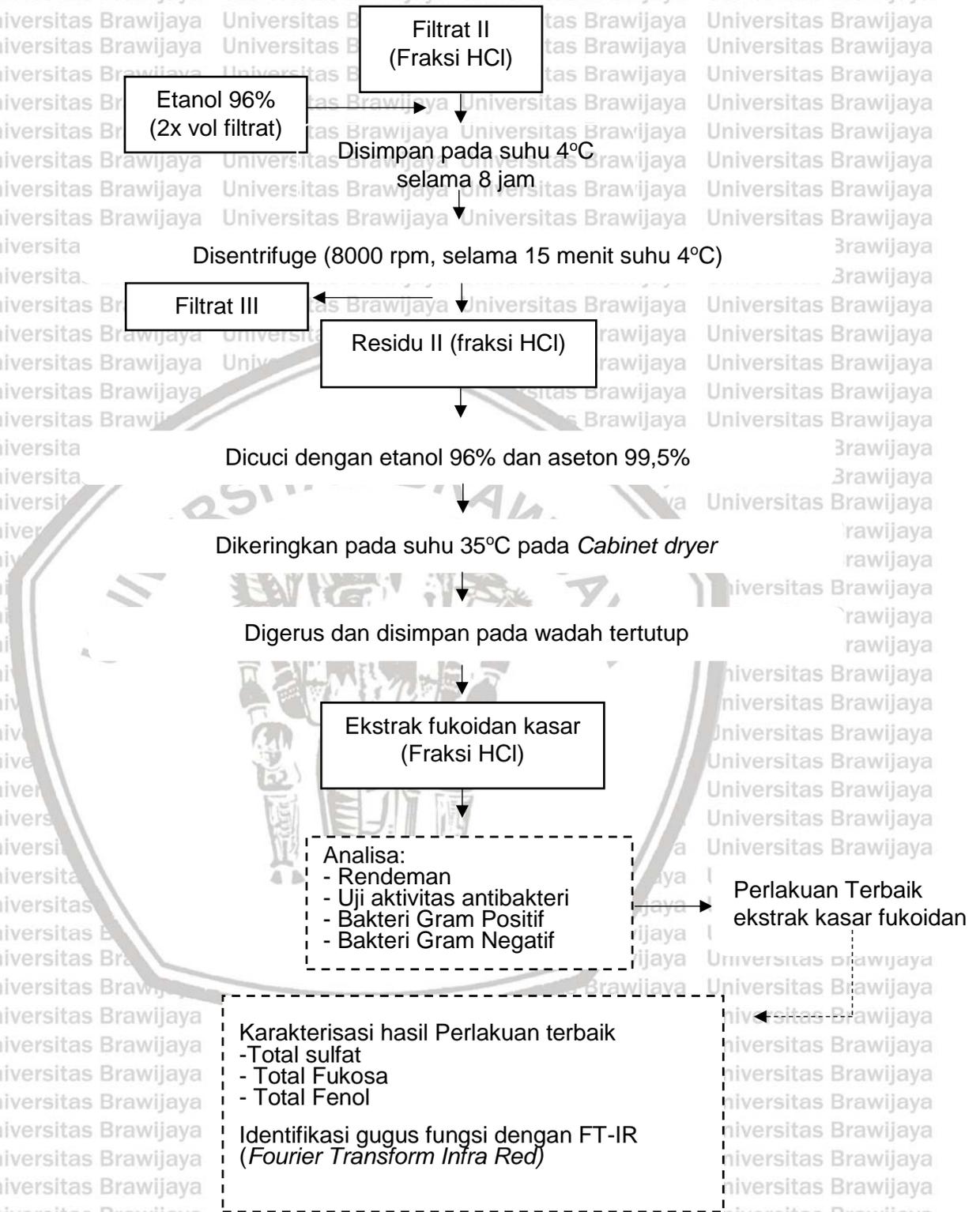
• **Diagram Alir Estraksi Fukoidan**



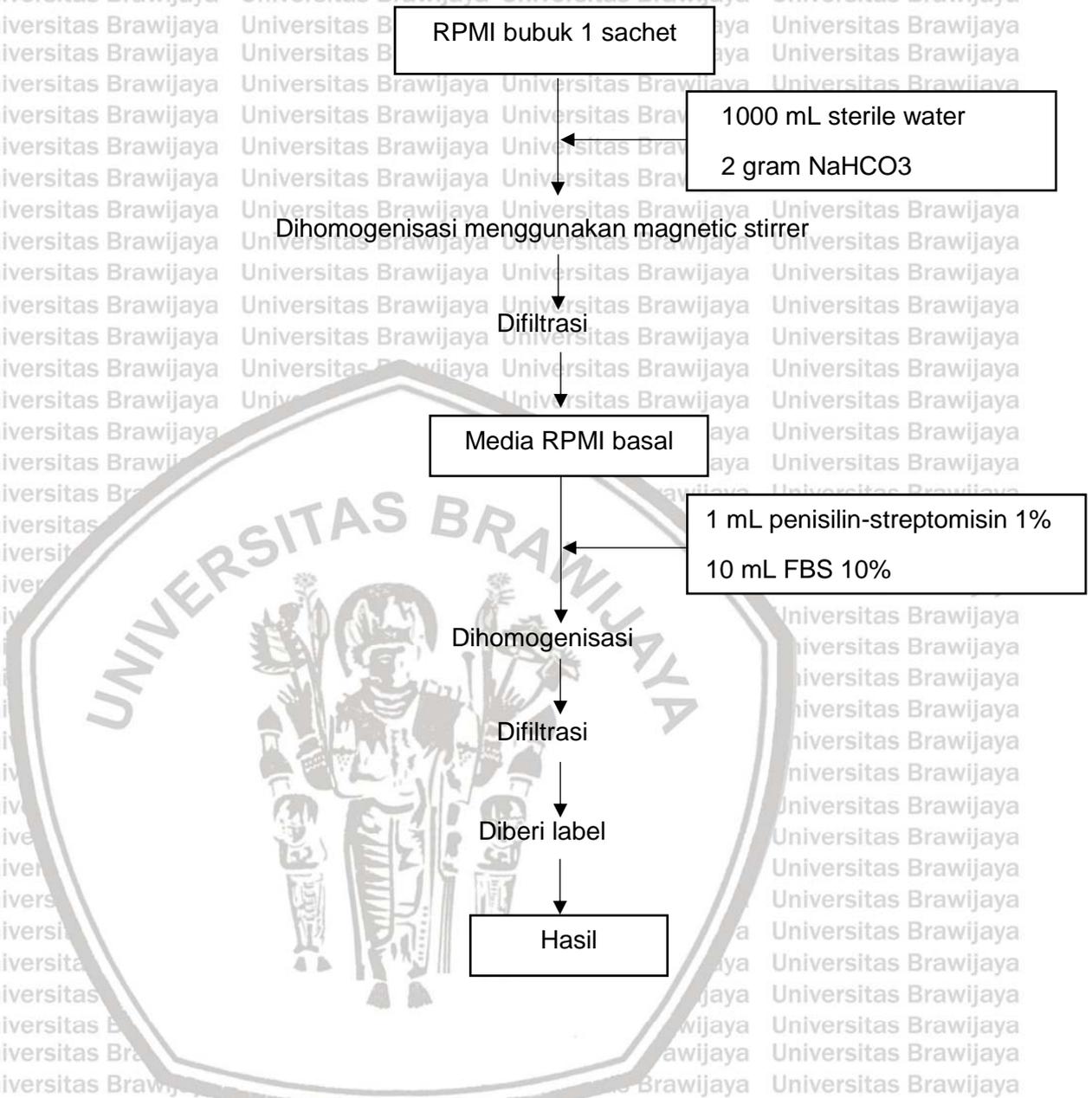
• **Diagram Alir Presipitasi Alginat**



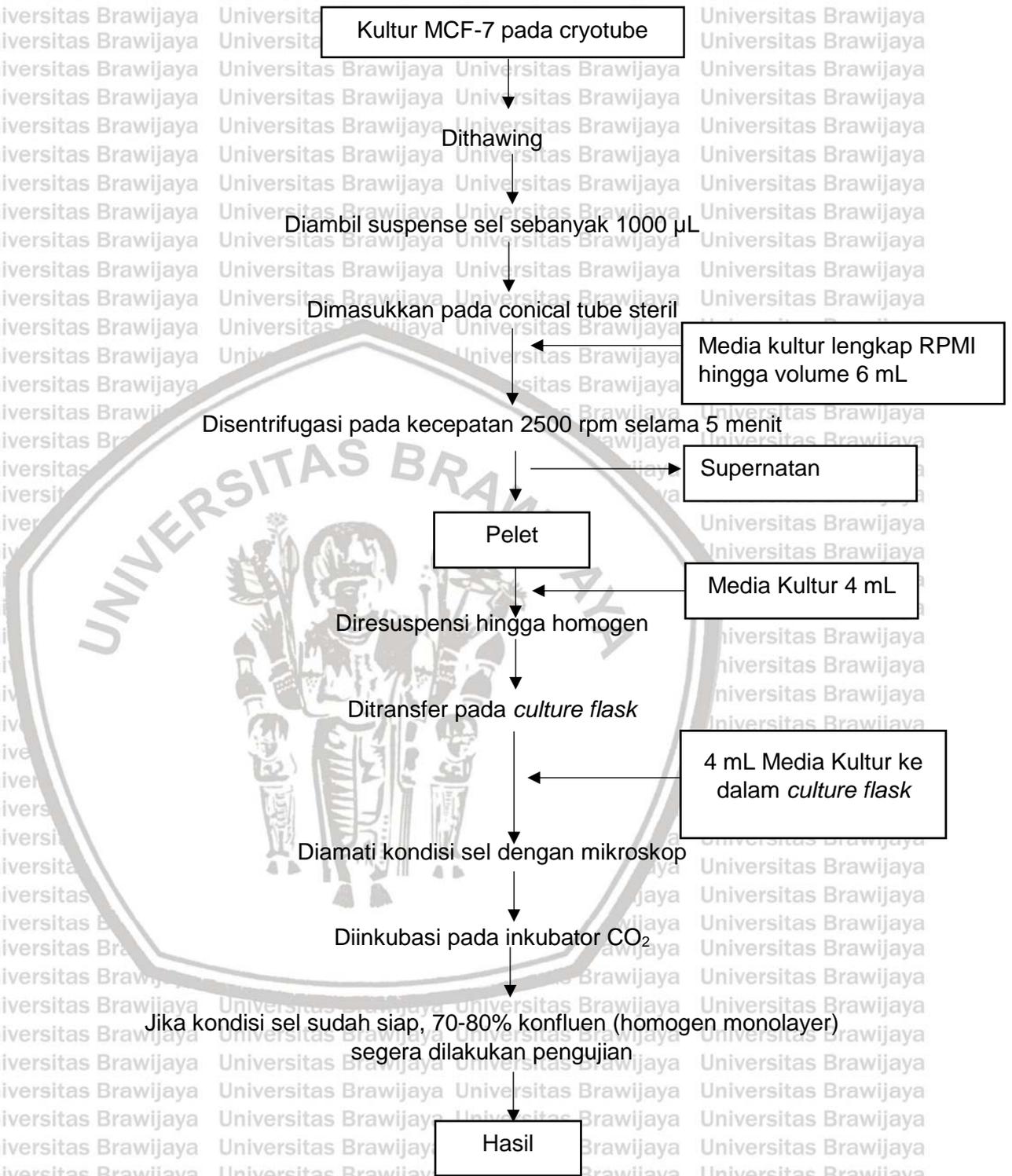
• **Diagram Alir Presipitasi Fukoidan**



## 2. Pembuatan Media Kultur Lengkap RPMI



3. Penumbuhan Sel MCF-7



4. Penggantian Media Sel MCF-7

Sel dari inkubator CO<sub>2</sub>

Dibuang media menggunakan spuit 10 mL

PBS 5 mL

Dicuci dengan 2x pengulangan

5 mL media kultur

Diamati kondisi sel

Hasil

5. Pemanenan Sel MCF-7

Sel dari inkubator CO<sub>2</sub>

Dibuang media menggunakan spuit 10 mL

PBS 5 mL

Dicuci dengan 2x pengulangan

Tripsin-EDTA 0,25%  
sebanyak 1,5 mL

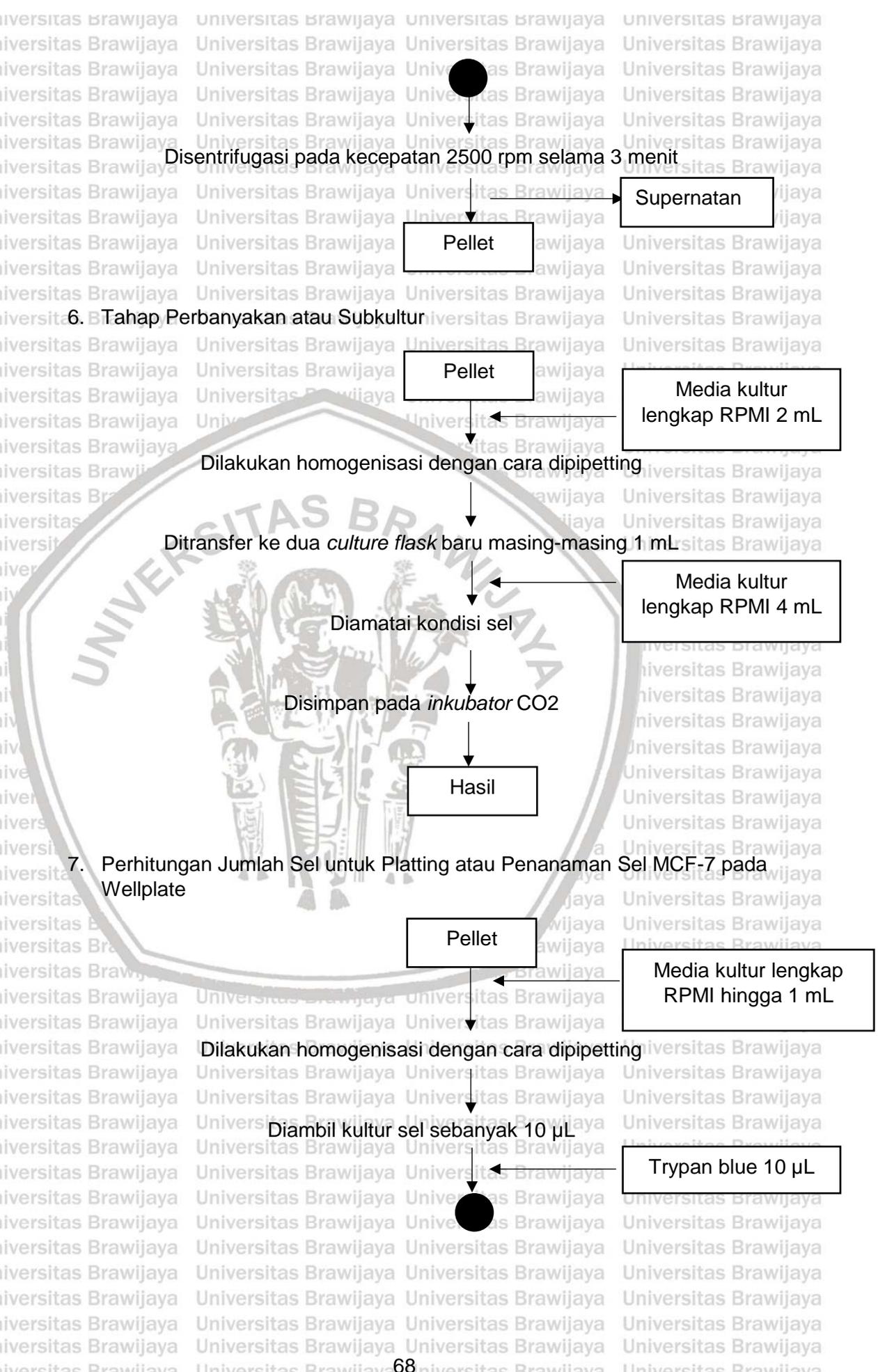
Diinkubasi selama 2 menit

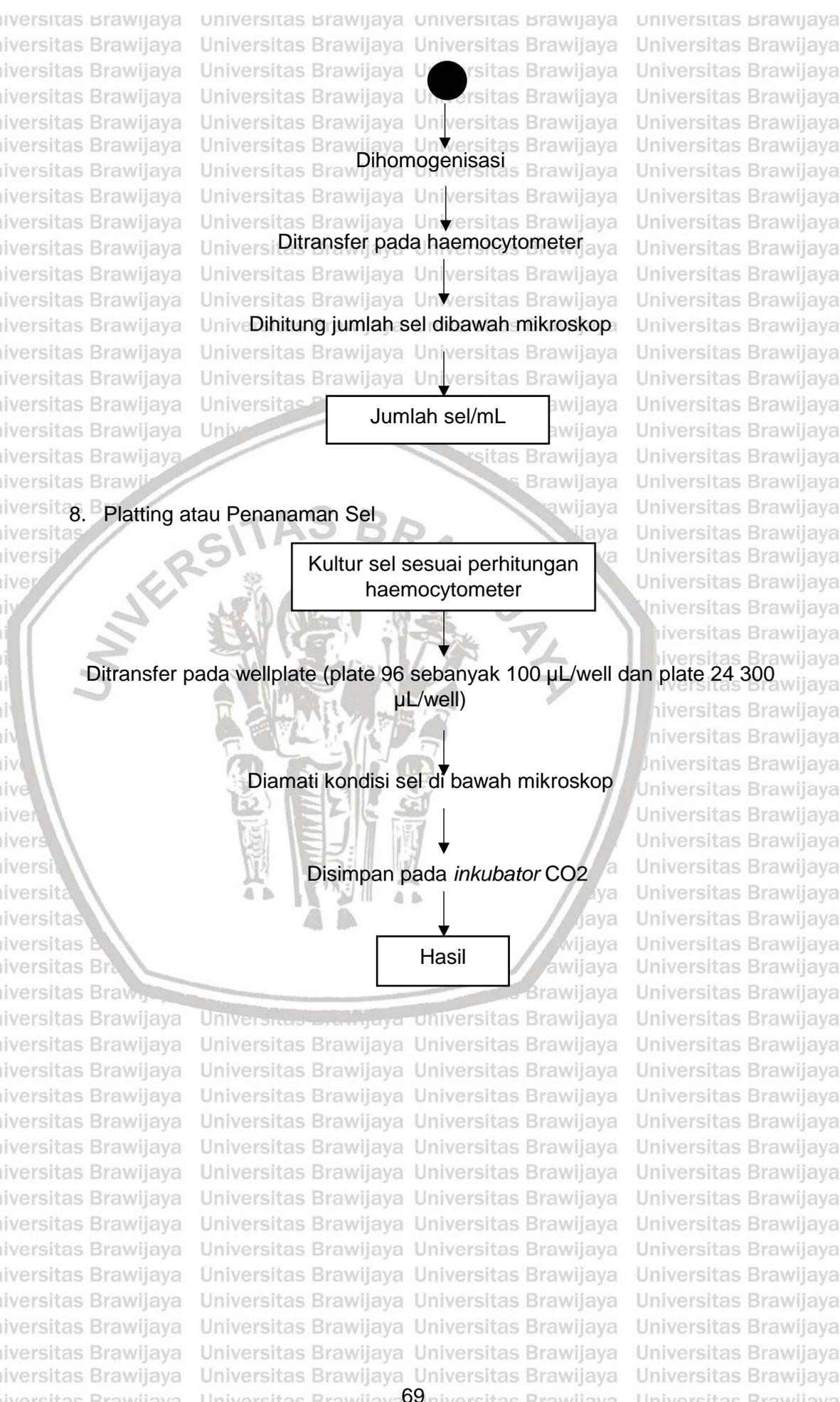
5 mL media kultur

Diamati kondisi sel

Dipipetting dan ditransfer ke konikel steril baru







Dihomogenisasi

Ditransfer pada haemocytometer

Dihitung jumlah sel dibawah mikroskop

Jumlah sel/mL

### 8. Platting atau Penanaman Sel

Kultur sel sesuai perhitungan haemocytometer

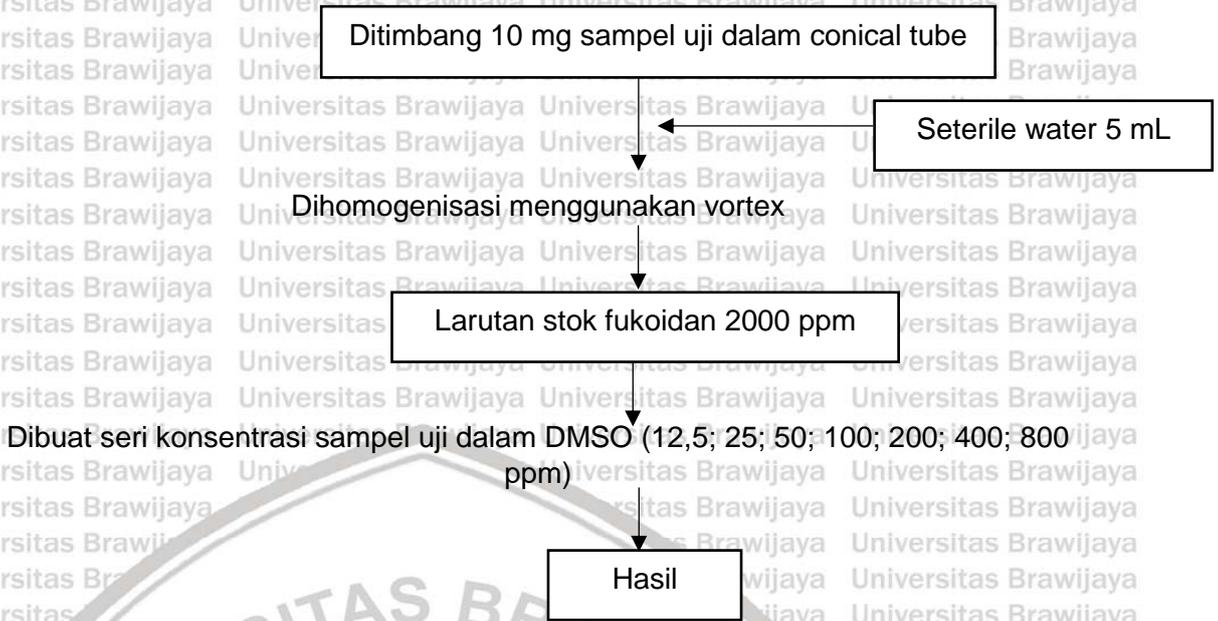
Ditransfer pada wellplate (plate 96 sebanyak 100  $\mu$ L/well dan plate 24 300  $\mu$ L/well)

Diamati kondisi sel di bawah mikroskop

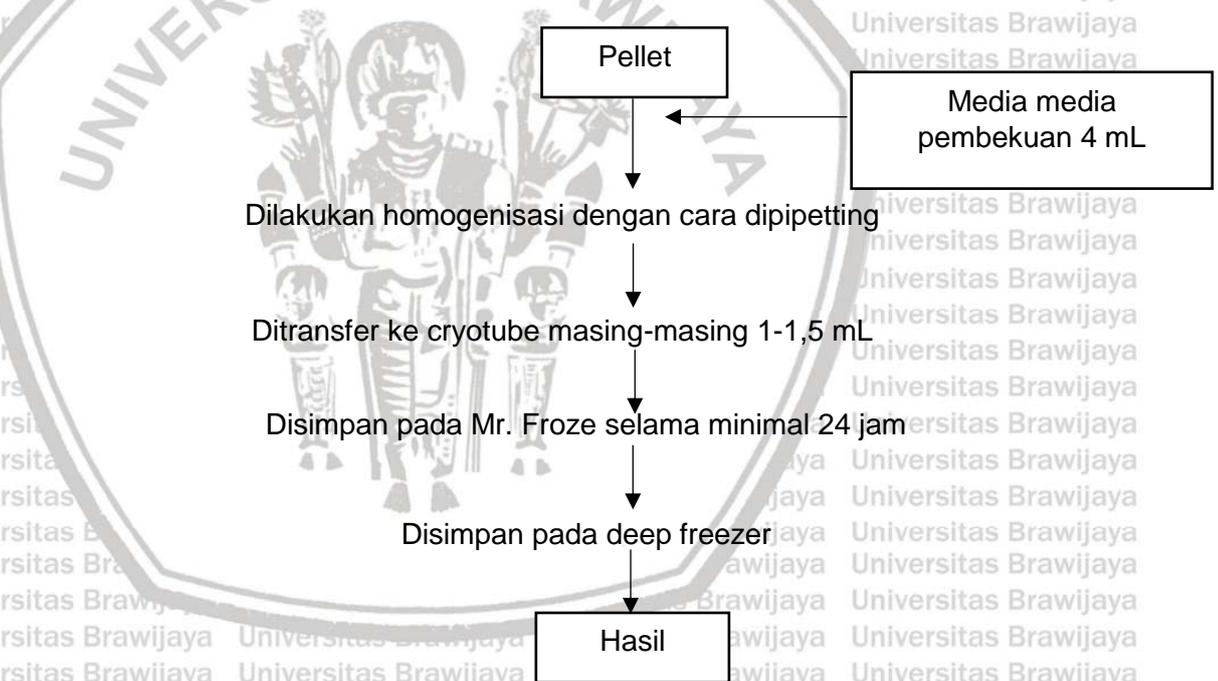
Disimpan pada inkubator CO<sub>2</sub>

Hasil

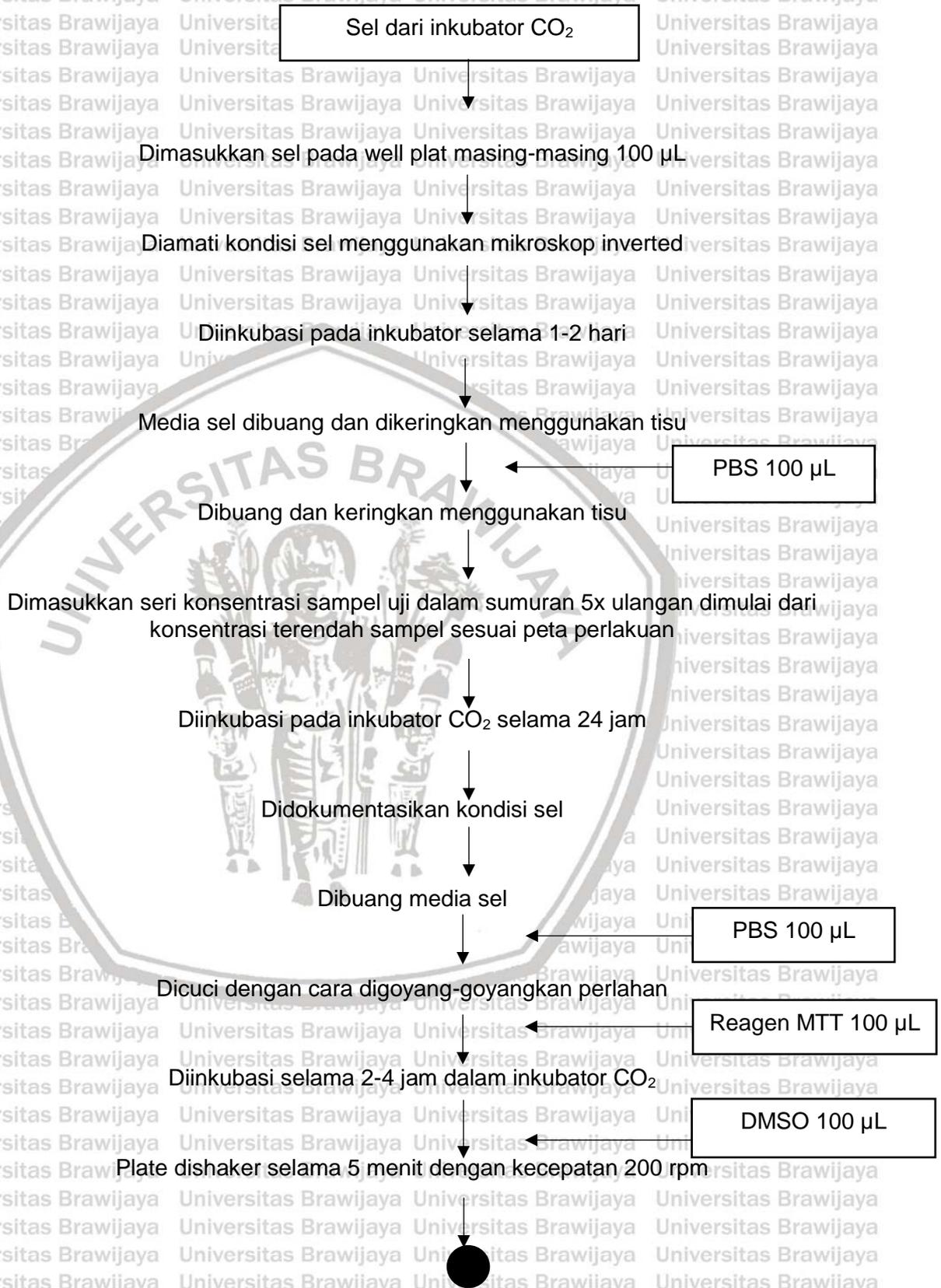
9. Pembuatan Larutan Sampel Fukoidan



10. Pembekuan Sel MCF-7



11. Pengujian Sitotoksik dengan MTT Assay



Dilakukan analisa menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm

Dilakukan perhitungan  $IC_{50}$

Hasil

## 12. Pengujian Jumlah Sel Hidup menggunakan Haemocytometer

Sel yang diplating pada wellplate dikeluarkan dari inkubator  $CO_2$

Dibuang media kultur dan dikeringkan dengan tisu

Ditambahkan sampel uji

Diinkubasi selama 24, 48, dan 72 jam pada *inkubator*  $CO_2$

Sampel uji dibang

Dicuci dengan 2x pengulangan

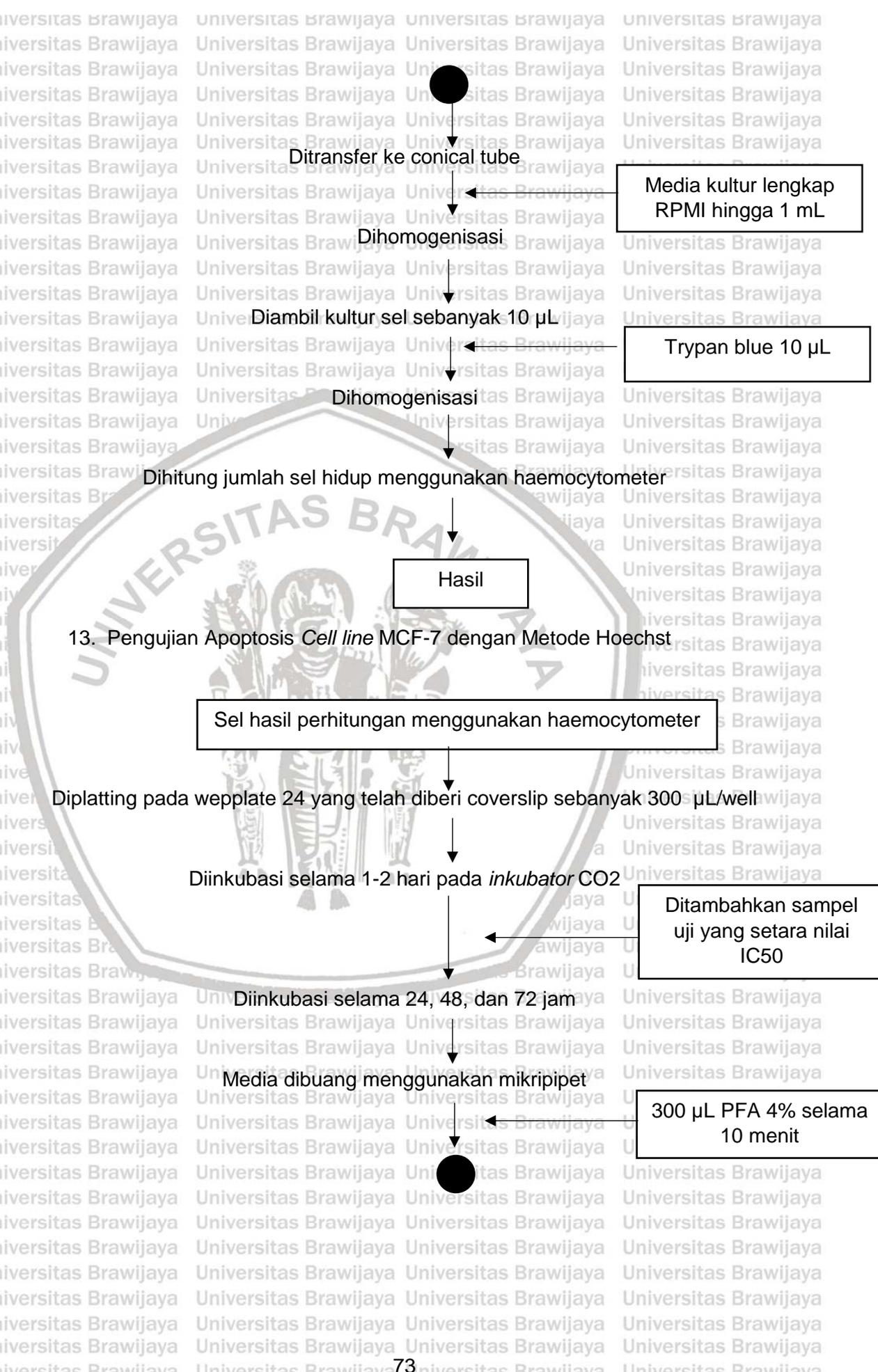
Diinkubasi selama 2 menit

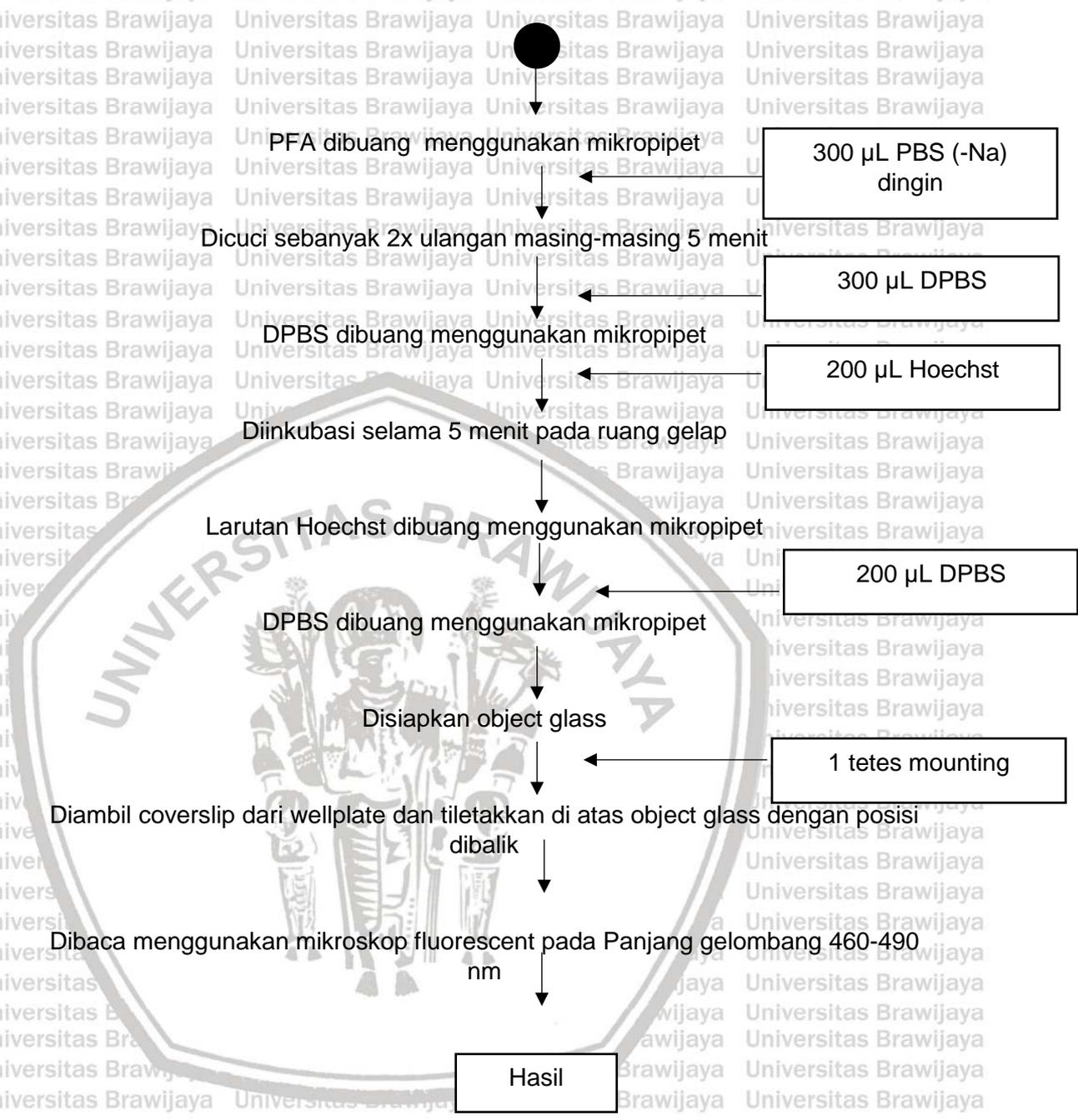
Dihomogenisasi dengan cara dipipetting

PBS 100  $\mu$ L

Trypsin-EDTA 40  $\mu$ L

Media kultur lengkap RPMI 100  $\mu$ L





## Lampiran 2. Perhitungan Pengenceran Bertingkat Sampel Uji Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl

Perhitungan bertingkat berasal dari larutan stok Sampel Uji Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl 2000 ppm menggunakan rumus pengenceran yaitu:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Dimana:

$M_1$  = Konsentrasi sampel larutan stok

$V_1$  = Volume larutan stok yang dibutuhkan untuk pengenceran

$M_2$  = Konsentrasi pengenceran yang diinginkan

$V_2$  = Volume pengenceran yang diinginkan

### 1. Untuk mendapatkan Sampel Uji Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl 800 ppm

$$2000 \text{ ppm} \times V_1 = 800 \text{ ppm} \times (600 + 650) \mu\text{L}$$

$$V_1 = 500 \mu\text{L} \text{ larutan stok fukoidan } 2000 \text{ ppm} + \text{ media kultur lengkap RPMI } 750 \mu\text{L}$$

### 2. Untuk mendapatkan Sampel Uji Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl 400 ppm

$$800 \text{ ppm} \times V_1 = 400 \text{ ppm} \times (600 + 650) \mu\text{L}$$

$$V_1 = 625 \mu\text{L} \text{ larutan stok fukoidan } 800 \text{ ppm} + \text{ media kultur lengkap RPMI } 625 \mu\text{L}$$

### 3. Untuk mendapatkan Sampel Uji Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl 200 ppm

$$400 \text{ ppm} \times V_1 = 200 \text{ ppm} \times (600 + 650) \mu\text{L}$$

$$V_1 = 625 \mu\text{L} \text{ larutan stok fukoidan } 400 \text{ ppm} + \text{ media kultur lengkap RPMI } 625 \mu\text{L}$$

### 4. Untuk mendapatkan Sampel Uji Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl 100 ppm

$$200 \text{ ppm} \times V_1 = 100 \text{ ppm} \times (600 + 600) \mu\text{L}$$

$$V_1 = 600 \mu\text{L} \text{ larutan stok fukoidan } 200 \text{ ppm} + \text{ media kultur lengkap RPMI } 600 \mu\text{L}$$

### 5. Untuk mendapatkan Sampel Uji Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl 50 ppm

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 50 \text{ ppm} \times (600 + 500) \mu\text{L}$$

$$V_1 = 550 \mu\text{L} \text{ larutan stok fukoidan } 100 \text{ ppm} + \text{ media kultur lengkap RPMI } 550 \mu\text{L}$$

6. Untuk mendapatkan Sampel Uji Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl 25 ppm

$$50 \text{ ppm} \times V_1 = 25 \text{ ppm} \times (600 + 350) \mu\text{L}$$

$V_1 = 475 \mu\text{L}$  larutan stok fukoidan 50 ppm +  
media kultur lengkap RPMI 475  $\mu\text{L}$

7. Untuk mendapatkan Sampel Uji Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl 12,5 ppm

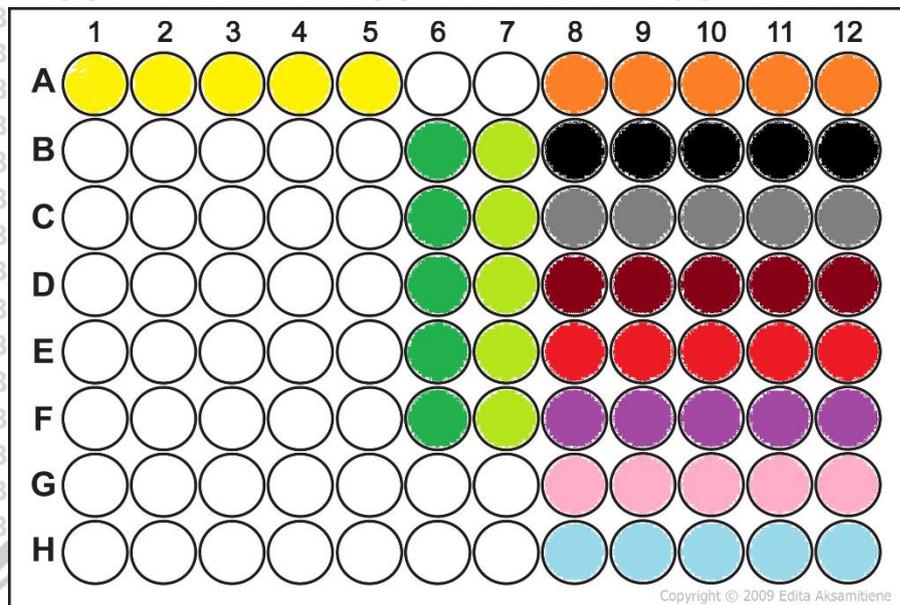
$$25 \text{ ppm} \times V_1 = 12,5 \text{ ppm} \times 600 \mu\text{L}$$

$V_1 = 300 \mu\text{L}$  larutan stok fukoidan 50 ppm +  
media kultur lengkap RPMI 300  $\mu\text{L}$



Lampiran 3. Denah Wellplate untuk Pengujian

1. Wellplate 96 untuk Uji MTT Assay

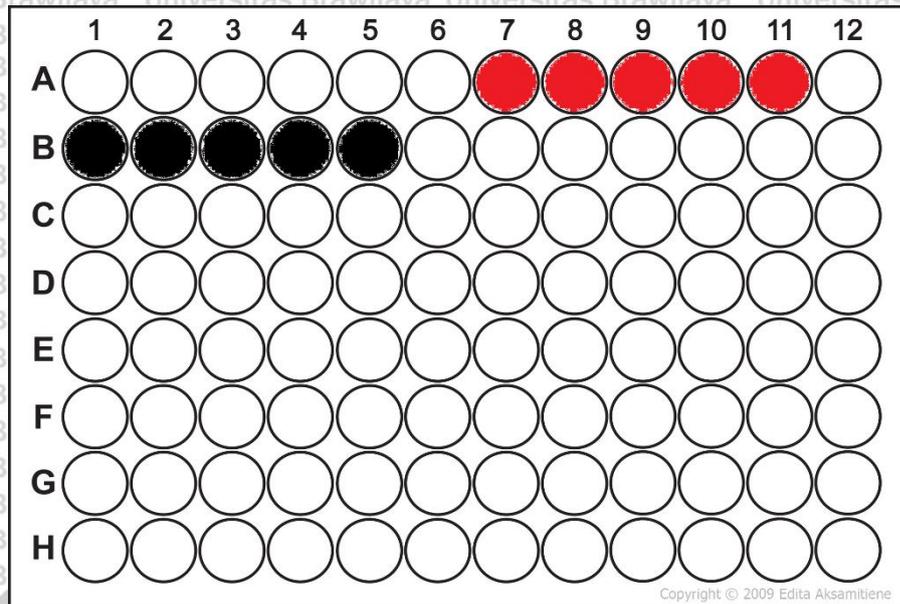


Copyright © 2009 Edita Aksamitene

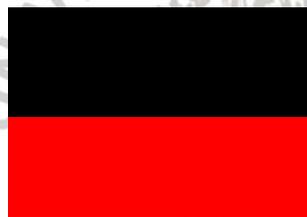
Keterangan:

- = Blanko (A1-A5)
- = Kontrol Pelarut (B6, C6, D6, E6, F6)
- = Kontrol Sel (B7, C7, D7, E7, F7)
- = Kontrol Media (A8-A12)
- = Perlakuan Ekstrak Fukoidan 12,5 ppm (B8-B12)
- = Perlakuan Ekstrak Fukoidan 25 ppm (C8-C12)
- = Perlakuan Ekstrak Fukoidan 50 ppm (D8-D12)
- = Perlakuan Ekstrak Fukoidan 100 ppm (E8-E12)
- = Perlakuan Ekstrak Fukoidan 200 ppm (F8-F12)
- = Perlakuan Ekstrak Fukoidan 400 ppm (G8-G12)
- = Perlakuan Ekstrak Fukoidan 800 ppm (H8-H12)

2. Wellplate 96 untuk Uji Jumlah Sel Hidup menggunakan Haemocytometer



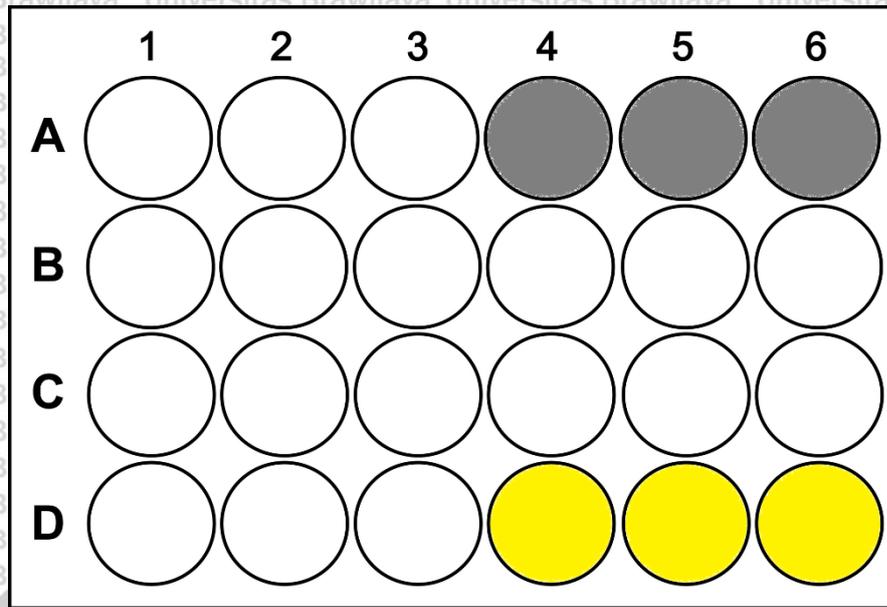
Keterangan:



= Sel Uji (Kultur sel + ekstrak fukoidan 287 ppm) (B1-B5)

= Kontrol Sel (Kultur Sel + Media Kultur Lengkap RPMI) (A7-A11)

3. Wellplate 24 untuk Uji Apoptosis menggunakan Metode Hoechst 33342



Keterangan:



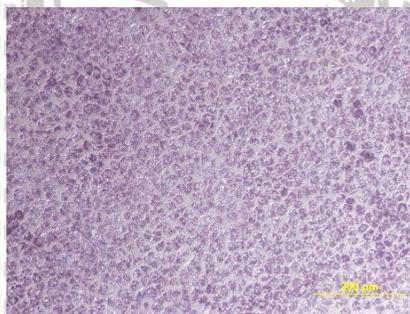
= Sel Uji (Kultur sel + ekstrak fukoidan 287 ppm) (A4-A6)



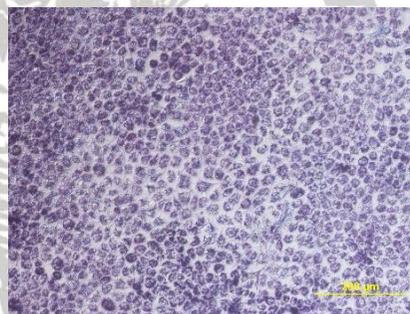
= Kontrol Sel (Kultur Sel + Media Kultur Lengkap RPMI) (D4-D6)

**Lampiran 4.** Gambar Kondisi Sel Setelah Diberi Perlakuan Variasi Sampel Uji 0-800 ppm Selama 24 Jam dan Diberi Reagen MTT Dilihat Menggunakan Mikroskop Inverted pada Perbesaran 100x

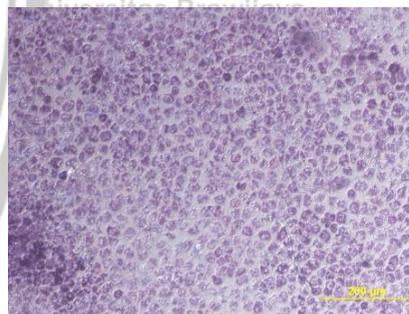
Kontrol Sel (0 ppm)



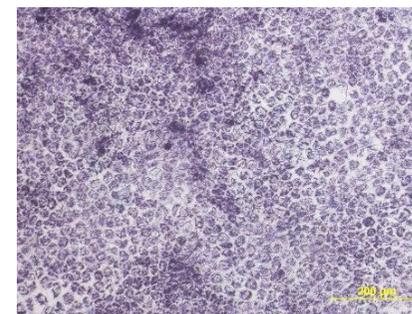
Sel Uji (12,5 ppm)



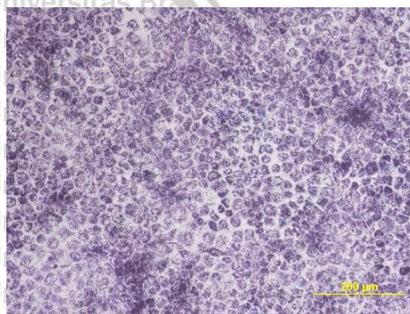
Sel Uji (25 ppm)



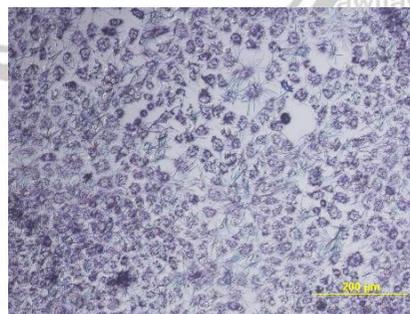
Sel Uji (50 ppm)



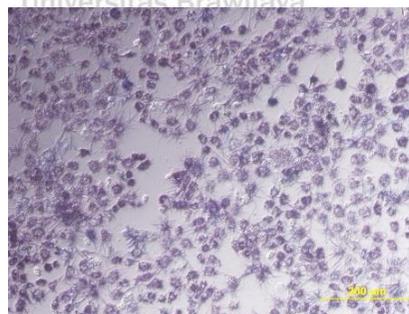
Sel Uji (100 ppm)



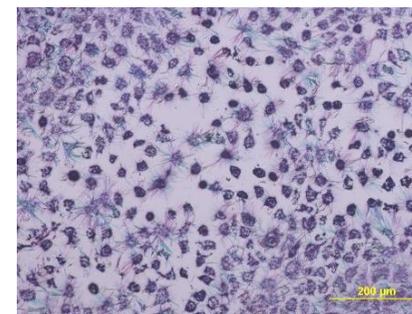
Sel Uji (200 ppm)



Sel Uji (400 ppm)



Sel Uji (800 ppm)



Lampiran 5. Hasil Uji MTT Assay

Konsentrasi Sampel Uji (ppm)	Log Konsentrasi Sampel Uji	Absorbansi Ulangan 1	Absorbansi Ulangan 2	Absorbansi Ulangan 3	Rata-rata Absorbansi Uji MTT Assay	% Viabilitas Ulangan 1 (%)	% Viabilitas Ulangan 2 (%)	% Viabilitas Ulangan 3 (%)	Rata-rata % Viabilitas (%)
12,5	1,097	1,179	1,264	1,337	1,26 ± 0,08	75,039	81,669	87,363	81,36 ± 6,17
25	1,398	1,159	1,228	1,333	1,24 ± 0,09	73,479	78,861	87,051	79,80 ± 6,83
50	1,699	1,155	1,206	1,268	1,21 ± 0,06	73,167	77,145	81,981	77,43 ± 4,41
100	2,000	0,902	1,026	1,161	1,03 ± 0,13	53,432	63,105	73,635	63,39 ± 10,10
200	2,301	0,833	0,930	0,965	0,91 ± 0,07	48,050	55,616	58,346	54,00 ± 5,33
400	2,602	0,736	0,92	0,874	0,84 ± 0,10	40,484	54,836	51,248	48,86 ± 7,47
800	2,903	0,605	0,618	0,695	0,64 ± 0,05	30,265	31,279	37,285	32,94 ± 3,79



Lampiran 6. Hasil Perhitungan Sel Hidup menggunakan Haemocytometer

A. Sel Uji MCF-7

Waktu Inkubasi 24 Jam								
Ulangan	Jumlah Sel/Kotak				Total	SD	Rerata	Jumlah Sel/mL
	A	B	C	D				
1	4	5	6	2	17	2	17	42.500
2	3	6	6	4	19			
3	3	5	3	4	15			

Waktu Inkubasi 48 Jam								
Ulangan	Jumlah Sel/Kotak				Total	SD	Rerata	Jumlah Sel/mL
	A	B	C	D				
1	5	5	8	8	26	2,517	25,667	64.166,667
2	4	7	9	3	23			
3	8	4	5	11	28			

Waktu Inkubasi 72 Jam								
Ulangan	Jumlah Sel/Kotak				Total	SD	Rerata	Jumlah Sel/mL
	A	B	C	D				
1	14	5	11	12	42	2,646	41	102.500
2	6	17	6	9	38			
3	9	16	6	12	43			

B. Kontrol Sel

Waktu Inkubasi 24 Jam								
Ulangan	Jumlah Sel/Kotak				Total	SD	Rerata	Jumlah Sel/mL
	A	B	C	D				
1	17	8	6	3	34	4,510	34,333	85.833,333
2	6	7	20	6	39			
3	11	7	8	4	30			

Waktu Inkubasi 48 Jam								
Ulangan	Jumlah Sel/Kotak				Total	SD	Rerata	Jumlah Sel/mL
	A	B	C	D				
1	19	12	7	23	61	1,528	60,667	151.666,667
2	19	17	10	13	59			
3	17	14	12	19	62			

Waktu Inkubasi 72 Jam								
Ulangan	Jumlah Sel/Kotak				Total	SD	Rerata	Jumlah Sel/mL
	A	B	C	D				
1	40	30	18	57	145	2,517	145,333	363.333,333
2	38	44	28	33	143			
3	43	45	35	25	148			

C. Viabilitas Sel

Viabilitas sel dihitung menggunakan perhitungan:

$$\% \text{ Viabilitas Sel} = \frac{\text{Jumlah sel uji } \left(\frac{\text{sel}}{\text{mL}}\right)}{\text{Jumlah kontrol sel } \left(\frac{\text{sel}}{\text{mL}}\right)} \times 100\%$$

Waktu Inkubasi (Jam)	Viabilitas Sel (%)
24	49,515
48	42,308
72	28,211



Lampiran 7. Hasil Uji Analysis of Variance (ANOVA) pada Perlakuan Waktu Inkubasi dan Uji Lanjut Tukey

**One-way ANOVA: JUMLAH SEL/ML versus PERLAKUAN**

Method

Null hypothesis All means are equal  
 Alternative hypothesis At least one mean is different  
 Significance level  $\alpha = 0,05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
PERLAKUAN	3	P1; P2; P3

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
PERLAKUAN	2	5538888889	2769444444	76,69	0,000
Error	6	216666667	36111111		
Total	8	575555556			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
6009,25	96,24%	94,98%	91,53%

Means

PERLAKUAN	N	Mean	StDev	95% CI
P1	3	42500	5000	(34011; 50989)
P2	3	64167	6292	(55677; 72656)

**Tukey Pairwise Comparisons**

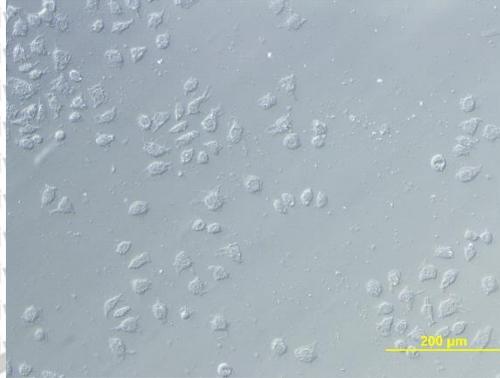
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

PERLAKUAN	N	Mean	Grouping
P3	3	102500	A
P2	3	64167	B
P1	3	42500	C

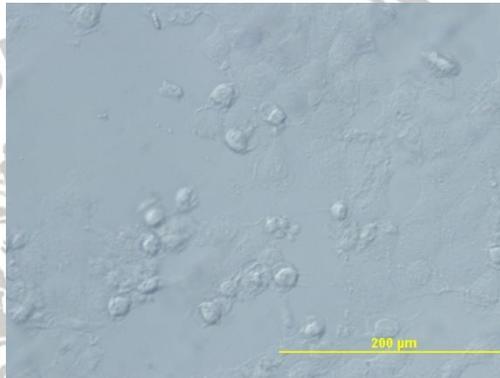
Means that do not share a letter are significantly different.

Lampiran 8. Dokumentasi Uji Hoechst 33342 Sebelum Proses Pewarnaan

Sel Uji 24 Jam



Sel Uji 48 Jam



Sel Uji 72 Jam

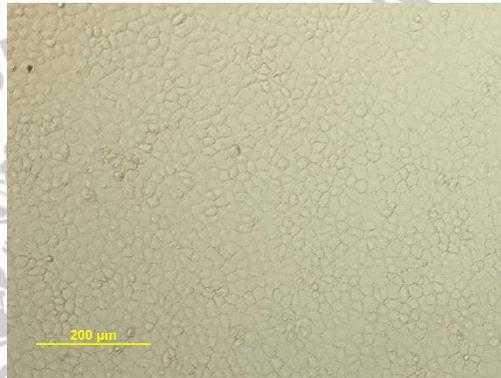


Lampiran 9. Dokumentasi Uji Jumlah Sel Hidup menggunakan Haemocytometer

Sel Uji 24 Jam



Sel Uji 48 Jam



Sel Uji 72 Jam

